



**HAL**  
open science

# Utilisation des ions métalliques pour le développement de biocapteurs optiques à base d'aptamères dédiés aux petites molécules

Blandine Billet

► **To cite this version:**

Blandine Billet. Utilisation des ions métalliques pour le développement de biocapteurs optiques à base d'aptamères dédiés aux petites molécules. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV098 . tel-04556488

**HAL Id: tel-04556488**

**<https://theses.hal.science/tel-04556488>**

Submitted on 23 Apr 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 : Sciences du Médicament

Unité de recherche : Département de Pharmaco chimie Moléculaire

### Utilisation des ions métalliques pour le développement de biocapteurs optiques à base d'aptamères dédiés aux petites molécules

### Use of metal ions for the development of small molecules aptamer-based optical biosensors

Présentée par :

**Blandine BILLET**

#### Direction de thèse :

**Eric PEYRIN**  
Université Grenoble Alpes  
**Corinne RAVELET**  
Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

Co-directrice de thèse

#### Rapporteurs :

**Michael RYCKELYNCK**  
PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Strasbourg  
**Marcel HOLLENSTEIN**  
CHARGE DE RECHERCHE HDR, Institut Pasteur

#### Thèse soutenue publiquement le **29 novembre 2023**, devant le jury composé de :

<b>Eric PEYRIN</b> PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes	Directeur de thèse
<b>Corinne RAVELET</b> PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes	Co-directrice de thèse
<b>Michael RYCKELYNCK</b> PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Strasbourg	Rapporteur
<b>Marcel HOLLENSTEIN</b> CHARGE DE RECHERCHE HDR, Institut Pasteur	Rapporteur
<b>Nicolas SPINELLI</b> PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes	Président
<b>Anne VARENNE</b> PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université Paris 6 - Pierre et Marie Curie	Examinatrice

#### Invités :

**Benoit CHOVELON**  
MAITRE DE CONFERENCES - PRATICIEN HOSPITALIER,  
**Patrice FAURE**  
PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER,









**Utilisation des ions métalliques pour le  
développement de biocapteurs optiques  
à base d'aptamères dédiés aux petites  
molécules**



## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma gratitude envers les membres du jury de cette thèse. Je souhaite tout particulièrement adresser mes remerciements au professeur **Michael Ryckelynck** et au docteur **Marcel Hollenstein** qui ont accepté la fonction de rapporteur et qui ont consacré une partie de leur temps à l'évaluation de ce travail. Je remercie également la professeure **Anne Varenne** pour avoir accepté d'examiner mon manuscrit, ainsi que le professeur **Nicolas Spinelli** qui a honoré le rôle de président du jury de cette soutenance et pour ses conseils lors de mon comité de suivi individuel.

Je remercie chaleureusement mes directeurs de thèse, les professeurs **Eric Peyrin** et **Corinne Ravelet**, pour m'avoir accueillie avec bienveillance au sein de l'équipe NOVA. Eric le « Zotero » humain, tes capacités de mémorisation des publis m'ont véritablement impressionnée. Merci à toi de m'avoir donné goût à la chimie analytique, un jour on se retrouvera à Papeete pour siroter un cocktail. Corinne la « cheffe avec un E », merci pour ta patience et tes précieux conseils, nos discussions sur les séries Netflix vont me manquer. Un grand merci à vous deux pour votre confiance, votre encadrement solide et votre bonne humeur quotidienne. Ces années avec vous ont été passionnantes et enrichissantes, et je suis heureuse d'avoir découvert le monde des aptamères !

Je tiens également à remercier le docteur **Benoit Chovelon** pour son aide et sa bienveillance tout au long de ce doctorat, ainsi que le professeur **Patrice Faure** pour avoir suivi mes travaux avec attention. C'est avec plaisir que je vous compte parmi les membres invités à cette soutenance.

Je souhaiterais remercier l'ensemble des membres du DPM que j'ai eu l'occasion de connaître durant ces quatre années, à commencer par la team « DPM and Chill ».

**Auriane**, ma partenaire de Bodyjam et de bac + 8 en réorganisation de labo, merci pour tous ces moments qu'on a pu partager, dans la joie comme dans la galère. N'oublions pas notre mantra : « et paf, ça fait des chocapics » !

**Jordan**, l'homme de la situation, toujours là pour venir nous voir et en profiter pour manger quelques réglisses... Merci pour ta bonne humeur, je te souhaite tout le meilleur chez nos amis les Belges.



**Juliette** et **Pauline**, les jumelles bactériologistes, merci pour toutes ces tranches de rire ! J'ai hâte de voir la transformation du DPM en laboratoire P3, et je compte sur vous pour perpétuer le goûter d'Halloween et la déco de Noël.

**Isaac** le pro de l'électrochimie qui vient souvent à l'improviste, merci pour ta positivité.

**Mel**, mon super binôme de l'année 2021, merci pour tout ce que tu m'as apporté et pour ton soutien qui perdure encore aujourd'hui. Je me rappellerai toujours de nos enchaînements de manips au Técan et des vidéos de glace carbonique qui fume... Ça a été un réel plaisir de travailler avec toi !

Merci également à **Aurélien** et **Matis**, la team COMET qui partage notre (super) bureau, et aux doctorants du 3eme étage avec qui nous avons l'occasion de partager quelques pizza party.

Merci aux étudiants et stagiaires rencontrés pour les bons moments passés ensemble. Mention spéciale à **Kenza** et ses pâtisseries délicieuses.

Un grand merci à **Pascale** et **Angèle**, mes gestionnaires préférées, qui sont toujours là en cas de besoin. **Véro**, ma confidente, merci pour ta présence et ta gentillesse, et pour toutes nos discussions couture, j'espère que tu trouveras la doudoune de tes rêves. **Luc**, merci pour tes cours de stats et tes conseils en matière de « sublimation ». Merci à tous les autres membres de l'équipe NOVA, **Sandrine**, **Florence**, **Farid**, **Annabelle**, **David**, **Mickaël**, ainsi qu'aux membres de l'équipe COMET. **Yung**, merci à toi pour ta disponibilité et ta bonne humeur.

Un grand merci à tous pour votre accueil, votre soutien, et pour tous les moments conviviaux que nous avons partagés ensemble (les JD2PM, les nombreux restos et goûters, les brunchs, les congrès à Oxford et Milan, la retraite d'écriture à Autrans...). Et je clôture ce paragraphe avec une mention spéciale au sacro-saint canapé qui a embelli les pauses midi !

Je tiens à remercier tous mes **amis** qui ont suivi de près ou de loin l'aboutissement de ce doctorat. J'ai une reconnaissance particulière pour celles et ceux auprès de qui j'ai pu me confier et qui m'ont apporté leur soutien, cela m'a été très précieux.

Je terminerai en remerciant ma **famille** qui a toujours été présente pour moi, dans les bons moments comme dans les moins joyeux. Merci pour votre soutien, vos encouragements, votre implication, et surtout pour les bons « tupp » du midi. Enfin, merci à toi **Noam** pour faire partie de ma vie depuis 8 ans, et qui m'a toujours soutenue dans mes décisions.

**« What we know is a drop, what we don't know is an ocean. » - Isaac Newton.**



# Table des matières

Remerciements .....	3
Liste des figures .....	9
Liste des tableaux .....	11
Liste des abréviations .....	12
<b>Introduction .....</b>	<b>15</b>
<b>Partie bibliographique .....</b>	<b>19</b>
1. Les ions métalliques .....	19
1.1. Généralités .....	19
1.1.1. Classification .....	19
1.1.2. Rôles .....	22
1.2. Interactions avec les acides nucléiques .....	23
1.2.1. Rappels sur les acides nucléiques .....	23
1.2.2. Types d'interaction .....	25
1.2.3. Impact sur les acides nucléiques .....	29
2. Les aptamères .....	31
2.1. Généralités .....	31
2.2. Production des aptamères .....	33
2.3. Avantages des aptamères .....	39
2.4. Applications des aptamères .....	40
2.4.1. En thérapie et vectorisation .....	40
2.4.2. En analyse et imagerie .....	44
2.5. Aptamères utilisés dans le cadre de la thèse .....	49
2.5.1. Aptamère anti-L-tyrosinamide .....	49
2.5.2. Aptamère anti-Adénosine .....	51
2.5.3. Aptamère anti-Aflatoxine B1 .....	53
2.5.4. Aptamère anti-Ochratoxine A .....	55
2.5.5. Aptamère anti-Cocaïne .....	57
3. Les biocapteurs à base d'aptamères .....	60
3.1. Définition d'un biocapteur .....	60
3.2. Détection de petites molécules .....	61
3.3. Types d'aptacapteurs .....	62
3.3.1. Configurations .....	62

3.3.2. Classification des aptacapteurs.....	63
3.3.2.1. Aptacapteurs électrochimiques .....	64
3.3.2.2. Aptacapteurs piézoélectriques .....	65
3.3.2.3. Aptacapteurs optiques.....	66
3.4. Aptacapteurs optiques basés sur la fluorescence .....	68
3.4.1. FRET .....	69
3.4.2. Anisotropie de fluorescence .....	70
<b>Résultats et discussion.....</b>	<b>77</b>
1. Utilisation de cations métalliques de transition et post-transition dans le développement d'un aptacapteur pour la détection de petites molécules par anisotropie de fluorescence. ..	77
2. Utilisation d'ions métalliques « quenchers » pour le développement d'un aptacapteur pour la détection de petites molécules par intensité de fluorescence.....	107
3. Utilisation d'ions métalliques de moindre toxicité via l'emploi d'aptamères modifiés (PS aptamères).....	135
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>141</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>145</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>167</b>
Annexe 1. Bilan de mon parcours et de mes contributions académiques.....	167
Annexe 2. Autorisation de l'éditeur John Wiley & Sons pour republier l'article n°1 dans le présent manuscrit.....	170
Annexe 3. Autorisation de l'éditeur Elsevier pour republier l'article n°2 dans le présent manuscrit. ....	170

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Représentation schématique de la configuration électronique de l'atome de carbone. .....	20
<b>Figure 2.</b> Tableau périodique des éléments, avec identification des différentes familles d'éléments chimiques. ....	21
<b>Figure 3.</b> Bases nucléiques retrouvées dans l'ADN et l'ARN. ....	23
<b>Figure 4.</b> Représentation de deux nucléotides reliés par une liaison phosphodiester. ....	24
<b>Figure 5.</b> Exemples de structures secondaires d'acides nucléiques .....	25
<b>Figure 6.</b> Types d'interaction entre les ions métalliques et l'ADN.....	26
<b>Figure 7.</b> Représentation simplifiée de quatre modèles de macrochélates.....	27
<b>Figure 8.</b> Sites de fixation préférentiels des ions métalliques sur l'ADN. ....	28
<b>Figure 9.</b> Mécanismes de liaison spécifique entre les acides nucléiques et les ions métalliques. .....	29
<b>Figure 10.</b> Classification simplifiée des ions métalliques en fonction de leur préférence de liaison avec les bases nucléiques et les groupements phosphate.....	30
<b>Figure 11.</b> Les différentes étapes de la méthode SELEX.....	34
<b>Figure 12.</b> Les différentes phases d'une étude clinique. ....	42
<b>Figure 13.</b> Procédés de vectorisation utilisant les aptamères. ....	43
<b>Figure 14.</b> Formes énantiomères du thalidomide. ....	44
<b>Figure 15.</b> Principe de la plateforme SOMAscan® .....	46
<b>Figure 16.</b> Structures de la L-tyrosine ( <b>A</b> ) et de la L-tyrosinamide ( <b>B</b> ).....	49
<b>Figure 17.</b> Mécanismes de sélection conformationnelle ( <b>A</b> ) et d'ajustement induit ( <b>B</b> ) appliqués à l'aptamère anti-L-tyrosinamide (23mer). ....	50
<b>Figure 18.</b> Structure de l'adénosine.....	51
<b>Figure 19.</b> Structure secondaire de l'aptamère anti-Adénosine libre ( <b>A</b> ) et lié ( <b>B</b> ). ....	52
<b>Figure 20.</b> Structure de l'aflatoxine B1. ....	53
<b>Figure 21.</b> Structure secondaire de l'aptamère anti-AFB1.....	54
<b>Figure 22.</b> Analogues structuraux de l'AFB1. ....	55
<b>Figure 23.</b> Structure de l'ochratoxine A. ....	55
<b>Figure 24.</b> Structure secondaire de l'aptamère anti-OTA (36mer). ....	56
<b>Figure 25.</b> Structure de la cocaïne. ....	57
<b>Figure 26.</b> Structure secondaire de l'aptamère anti-cocaïne (30mer) libre ( <b>A</b> ) et lié ( <b>B</b> ). ....	58
<b>Figure 27.</b> Représentation schématique d'un biocapteur conventionnel.....	60

<b>Figure 28.</b> Illustration d'une méthode « sandwich » dans le cadre du dosage d'une macromolécule (A) ou d'une petite molécule (B).....	61
<b>Figure 29.</b> Configurations d'aptacapteurs pour petites molécules selon les modèles TISS (A), TID (B) et remplacement compétitif (C). .....	63
<b>Figure 30.</b> Les différents modes de transduction d'un biocapteur. ....	63
<b>Figure 31.</b> Représentation schématique d'aptacapteurs piézoélectriques. ....	66
<b>Figure 32.</b> Schémas de FRET selon un format « signal-on » (A, B) et « signal-off (C).....	70
<b>Figure 33.</b> Principe de la technique d'anisotropie de fluorescence. ....	71
<b>Figure 34.</b> Méthodes d'analyse en anisotropie de fluorescence consistant à augmenter le volume apparent du fluorophore. ....	73
<b>Figure 35.</b> Méthodes d'analyse en anisotropie de fluorescence basées sur une détection directe. ....	74
<b>Figure 36.</b> Principe général d'une stratégie de commutation structurale régulée par les ions métalliques pour le développement d'un aptacapteur optique. ....	78
<b>Figure 37.</b> Structures de la fluorescéine (A) et du Texas Red (B). ....	79
<b>Figure 38.</b> Principe général d'un aptacapteur optique basé sur le quenching du Texas Red par des ions métalliques de transition.....	108
<b>Figure 39.</b> Représentation schématique de la méthode de quenching du Texas Red par des ions métalliques de transition en fonction de la structure secondaire de l'aptamère anti-L-tyrosinamide (A, hypothétique) et de l'aptamère anti-adénosine (B). ....	133
<b>Figure 40.</b> Représentation de deux nucléotides reliés par une liaison phosphorothioate.....	136
<b>Figure 41.</b> Anisotropie de fluorescence de l'aptamère 3'F-PS-apt-T, en fonction de la concentration en ion métallique, en absence ou en présence de 1 mM de L-Tym.....	137
<b>Figure 42.</b> Changement d'anisotropie de fluorescence de sondes aptamériques en fonction de la concentration en tyrosinamide, en présence ou non de 40 µM d'ion Zn <sup>2+</sup> . ....	139

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Nombre d'électrons pour les quatre premières couches électroniques. ....	20
<b>Tableau 2.</b> Exemples de ligands ciblés par des aptamères. ....	32
<b>Tableau 3.</b> Caractéristiques de certaines méthodes de détermination de l'affinité pour les petites molécules. ....	38
<b>Tableau 4.</b> Avantages des aptamères par rapport aux anticorps conventionnels. ....	40
<b>Tableau 5.</b> Aptamères en cours d'étude clinique. ....	42
<b>Tableau 6.</b> Dispositifs commercialisés destinés à la détection et au diagnostic in vitro. ....	47
<b>Tableau 7.</b> Caractéristiques des aptamères utilisés dans les travaux de cette thèse. ....	59
<b>Tableau 8.</b> Avantages et limites des stratégies basées sur une modification du temps de corrélation rotationnelle. ....	74
<b>Tableau 9.</b> Mesures de $K_d$ apparents ( $K_d^{app}$ ) entre les aptamères 3'F-PS-apt-Tym et 3'F-apt-Tym et les ions métalliques $Pb^{2+}$ , $Cd^{2+}$ , $Zn^{2+}$ et $Mn^{2+}$ .....	138



## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFB1	Aflatoxine B1
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AMP	Adénosine monophosphate
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BSI	Backscattering interferometry
CD	Dichroïsme circulaire (Circular dichroism)
CE	Électrophorèse capillaire (Capillary electrophoresis)
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer
Da	Dalton
DMLA	Dégénérescence maculaire lié à l'âge
EIS	Spectroscopie d'impédance électrochimique (Electrochemical impedance spectroscopy)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FDA	Food and Drug Administration
FET	Transistor à effet de champ (Field-effect transistor)
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FRET	Transfert d'énergie par résonance de type Förster (Förster resonance energy transfer)
GO	Oxyde de graphène (Graphene oxide)
HAS	Haute Autorité de Santé
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine ethane sulfonique
HSAB	Hard and Soft Acids and Bases
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ITC	Titration calorimétrique isotherme (Isothermal titration calorimetry)
IUPAC	Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée
KCE	Électrophorèse capillaire cinétique (Kinetic capillary electrophoresis)
L-Tym	L-tyrosinamide
MES	Acide-2-éthanosulfonique
MST	Thermophorèse à micro-échelle (Microscale thermophoresis)

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OTA	Ochratoxine A
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase chain reaction)
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEG	Polyéthylène glycol
POC	Point-of-care
PS	Phosphorothioate
QCM	Microbalance à cristal de quartz (Quartz crystal microbalance)
QD	Quantum dot
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère
SAW	Onde acoustique de surface (Surface acoustic wave)
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique (Size-exclusion chromatography)
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
SERS	Spectroscopie Raman exaltée en surface (Surface-enhanced Raman spectroscopy)
SMR	Service médical rendu
SPR	Résonance plasmonique de surface (Surface plasmon resonance)
TEMP	Tomographie par émission monophotonique
TEP	Tomographie par émission de positons
TFPI	Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
TID	Target-induced dissociation
TISS	Target-induced structure switching
TLR4	Toll-like receptor 4
TMR	Tétraméthylrhodamine
TNT	Trinitrotoluène
UV	Ultraviolet
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VHB	Virus de l'hépatite B
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine



# Introduction

---

La détection sensible et précise de petites molécules est essentielle dans diverses situations telles que le développement de produits pharmaceutiques, la sécurité alimentaire, la surveillance environnementale ou encore le diagnostic médical. Pour satisfaire à ces exigences réglementaires, il est nécessaire de disposer d'outils et de méthodes d'analyse fiables.

Les techniques chromatographiques, souvent considérées comme le « gold standard » pour de nombreux analytes, ont longtemps été privilégiées pour leur précision et leur sensibilité. Cependant, elles requièrent une instrumentation coûteuse et encombrante ainsi que du personnel qualifié.<sup>1,2</sup> Ces contraintes ont conduit les chercheurs à explorer de nouvelles approches pour répondre aux besoins actuels d'une analyse rapide pouvant s'effectuer directement sur le terrain. Dans cette optique, les biocapteurs sont apparus comme des solutions prometteuses, présentant les avantages d'une miniaturisation, d'une rapidité d'action, d'une facilité d'utilisation et d'une portabilité accompagnés d'un faible coût. Ces caractéristiques en font des outils très attractifs pour diverses applications médicales, environnementales et agroalimentaires.<sup>3</sup>

La conception d'un biocapteur fait appel à un élément de reconnaissance moléculaire, le plus souvent des anticorps. Ces derniers, bien qu'ils présentent une affinité élevée et une spécificité marquée envers l'analyte d'intérêt, comportent des inconvénients notables. Leur production nécessite l'usage de modèles animaux coûteux, et leur champ d'action est restreint aux substances immunogènes. De plus, ils se révèlent peu adaptés à la détection de petites molécules en raison de la différence de taille trop conséquente (1000 Da *versus* 150 kDa). Face à ces enjeux, il est apparu nécessaire d'explorer d'autres éléments de reconnaissance tels que les acides nucléiques, et plus particulièrement les aptamères. Ce sont des oligonucléotides simple brin synthétisés par un processus *in vitro* et ayant la capacité de se lier spécifiquement et avec une affinité élevée à une cible déterminée. Souvent qualifiés d'« anticorps synthétiques », ils présentent de nombreux avantages comparativement aux anticorps traditionnels. Parmi ceux-ci figurent la capacité de reconnaître des cibles non immunogéniques

et toxiques, de meilleures propriétés de stabilité et de conservation, ainsi qu'un coût de production réduit. Leur plus petite taille et leurs propriétés de changement de conformation tridimensionnelle constituent également des atouts majeurs pour la détection de petites molécules.<sup>2,4</sup> En raison de ces points forts, les aptamères bénéficient d'une expansion remarquable depuis leur découverte en 1990, enregistrant une part de marché global estimée à 723,6 millions de dollars en 2016, avec un taux de croissance annuel composé (CAGR pour Compound Annual Growth Rate) projeté à 28,2% entre 2018 et 2025.<sup>5</sup>

Les biocapteurs à base d'aptamères, appelés « aptacapteurs », existent sous divers schémas et configurations. Ils peuvent fonctionner soit en phase hétérogène, où l'élément de reconnaissance (ou la cible dans le cadre de méthodes compétitives) est immobilisé sur une surface, soit en phase homogène, où la réaction a lieu en solution sans nécessiter d'étape de séparation. Les stratégies actuellement employées reposent généralement sur la mise en œuvre d'un changement de conformation et/ou de structure significatif des aptamères. Ce processus de commutation peut être intrinsèque à certains aptamères ou provoqué artificiellement par l'introduction de compétiteurs tels que des oligonucléotides complémentaires ou des nanomatériaux. Cependant, ces approches impliquent souvent des étapes de post-sélection minutieuses ainsi qu'une connaissance précise et approfondie de la structure secondaire des aptamères. Dans un contexte où la simplicité de conception et d'utilisation des biocapteurs est primordiale en vue d'une utilisation sur le terrain, il est souhaitable d'élaborer des méthodes alternatives nécessitant un minimum de manipulations.

Mon travail de thèse s'est concentré sur la conception d'aptacapteurs optiques dédiés à la détection de petites molécules et opérant en phase homogène, en utilisant les ions métalliques comme éléments de commutation structurale. En effet, certains d'entre eux ont la capacité d'interagir avec les acides nucléiques de diverses manières, par le biais d'interactions électrostatiques et de liaisons de coordination au niveau des bases et des phosphates à différents degrés, affectant ainsi leur structure et leur conformation.<sup>6</sup> Cette propriété fait de ces éléments des candidats prometteurs pour l'élaboration de méthodes innovantes de détection de petites molécules d'intérêt biologique.

La première section de ce manuscrit sera consacrée à une étude bibliographique, qui abordera chaque aspect de mon sujet de thèse. Après avoir introduit quelques notions générales sur les ions métalliques, les différents types d'interactions engagées avec les acides nucléiques seront examinés. Ensuite, un intérêt spécifique sera accordé aux aptamères, en détaillant leur

mode de production ainsi que leurs multiples applications dans divers domaines. Les aptamères utilisés au cours de ces travaux feront également l'objet d'une description approfondie. Enfin, une dernière partie explorera les différents types de biocapteurs à base d'aptamères, avec une attention particulière portée sur les aptacapteurs basés sur la fluorescence.

La deuxième section de ce manuscrit présentera les différents projets de recherche menés, sous forme d'articles publiés dans des revues scientifiques ou de résultats préliminaires. Le premier article concerne le développement d'un aptacapteur régulé par les ions métalliques de transition et post-transition pour la détection de plusieurs petites molécules (L-tyrosinamide, aflatoxine B1, ochratoxine A et cocaïne) par anisotropie de fluorescence. Le second article propose un aptacapteur utilisant des ions métalliques « quenchers » pour la détection de L-tyrosinamide et d'adénosine par intensité de fluorescence. Le dernier projet est présenté sous forme de résultats préliminaires et consiste en l'amélioration de notre stratégie grâce à l'utilisation d'ions métalliques de moindre toxicité pour la santé et l'environnement au travers de l'utilisation d'aptamères modifiés.

Enfin, la dernière section de ce manuscrit permettra de conclure et d'envisager des perspectives à ce travail.



# Partie bibliographique

---

## 1. Les ions métalliques

### 1.1. Généralités

#### 1.1.1. Classification

Le tableau périodique des éléments a été introduit pour la première fois en 1869 par le chimiste russe Dmitri Mendeleïv. Il permet de classer les éléments chimiques selon leur nombre de protons (numéro atomique) et la répartition de l'ensemble de leurs électrons au sein de différentes couches de niveaux d'énergie, subdivisées en sous-couches (configuration électronique).<sup>7</sup>

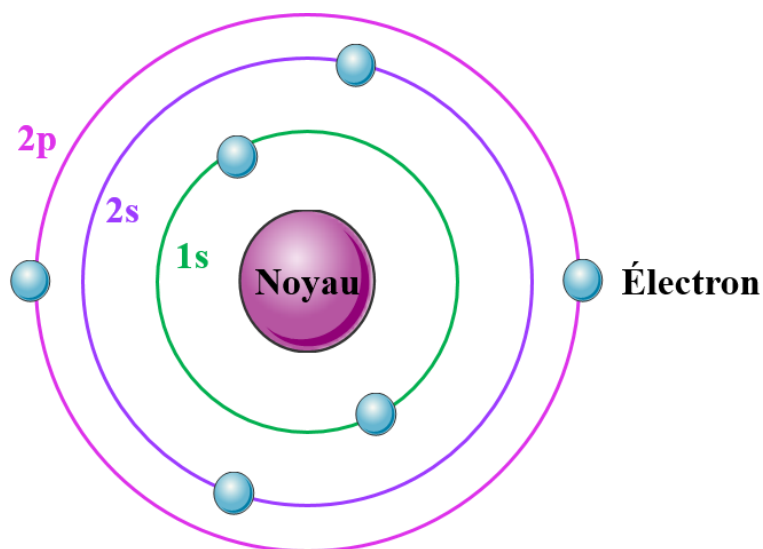
La configuration électronique d'un atome suit une structure bien définie. Ainsi, une couche électronique  $n$  est capable d'accueillir un maximum de  $2n^2$  électrons, tandis qu'une sous-couche  $\ell$  peut contenir jusqu'à  $2(2\ell+1)$  électrons.<sup>7</sup> Le nombre d'électrons correspondant aux quatre premières couches électroniques est résumé dans le Tableau 1 ci-dessous.



**Tableau 1.** Nombre d'électrons pour les quatre premières couches électroniques.

<i>n</i>	<i>ℓ</i>	Sous-couche	Nombre d'électrons	
			Sous-couche	Couche
1	0	1s	2	2
2	0	2s	2	8
	1	2p	6	
3	0	3s	2	18
	1	3p	6	
	2	3d	10	
4	0	4s	2	32
	1	4p	6	
	2	4d	10	
	3	4f	14	

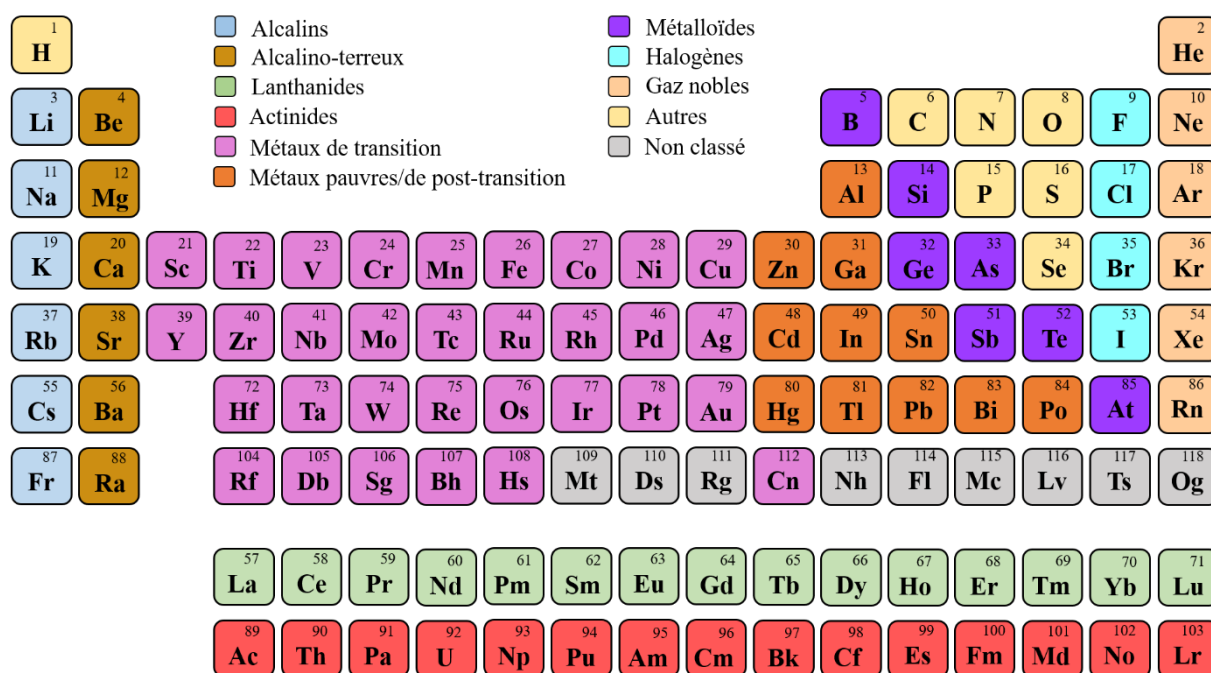
À titre d'exemple, la Figure 1 ci-dessous illustre la configuration électronique de l'atome de carbone, possédant 6 électrons répartis de façon suivante :  $1s^2 2s^2 2p^2$ .



**Figure 1.** Représentation schématisée de la configuration électronique de l'atome de carbone.

Le tableau périodique des éléments est organisé en sept lignes horizontales appelées « périodes », qui regroupent des atomes ayant les mêmes couches électroniques occupées. Le passage à une nouvelle période survient lorsqu'une couche électronique supplémentaire commence à se remplir.

Chaque colonne du tableau rassemble des atomes ayant le même nombre d'électrons de valence, c'est-à-dire des électrons situés au niveau de la couche externe. Les électrons de valence sont d'une grande importance dans la création de liaisons chimiques et sont fortement impliqués dans la réactivité des éléments et la formation de composés ioniques.<sup>7,8</sup>



**Figure 2.** Tableau périodique des éléments, avec identification des différentes familles d'éléments chimiques.

Comme illustré dans la Figure 2 ci-dessus, le tableau périodique des éléments permet d'identifier plusieurs familles d'éléments chimiques présentant des configurations électroniques et des propriétés physico-chimiques similaires.<sup>7,9</sup>

Les métaux alcalins et alcalino-terreux, situés dans les deux premières colonnes, sont des éléments très réactifs ayant la capacité de former aisément des cations monovalents ou divalents en cédant leurs électrons de valence. Les métaux de transition sont définis par l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) comme étant « des éléments chimiques dont les atomes ont une sous-couche électronique *d* incomplète, ou qui peuvent former des

cations dont la sous-couche électronique  $d$  est incomplète ». <sup>10</sup> Les métaux de post-transition, quant à eux, possèdent une sous-couche électronique  $d$  complète et ont tendance à former des liaisons covalentes avec d'autres éléments. La plupart des éléments appartenant aux familles des lanthanides ou des actinides ont la particularité d'avoir une sous-couche électronique  $f$  incomplète. Le groupe des métalloïdes contient des composés présentant des propriétés intermédiaires entre celles des métaux et celles des « non-métaux ». La colonne des halogènes comprend des éléments électronégatifs capables de former des anions monovalents, et possèdent une réactivité importante vis-à-vis des métaux. Au contraire, les gaz nobles présentent une forte inertie chimique en raison de leur couche de valence saturée, et constituent donc une famille d'éléments très stables. <sup>7</sup>

### 1.1.2. Rôles

Les ions métalliques sont des éléments portant une ou plusieurs charges positives, formés à partir d'atomes appartenant aux familles des alcalins, des alcalino-terreux, des métaux de transition et de post-transition, des lanthanides ou des actinides. Certains d'entre eux jouent un rôle crucial dans de nombreuses fonctions biologiques, justifiant leur inclusion dans la composition de solutions tampon. Par exemple, les ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) et potassium ( $\text{K}^+$ ) participent à une diversité de processus physiologiques, notamment au niveau neurologique, musculaire et cardio-vasculaire. Les ions magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ), cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) et manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ) interviennent dans l'activité de diverses enzymes en tant que cofacteurs. Les ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sont essentiels au bon fonctionnement du métabolisme osseux. Les ions cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ) sont indispensables à la synthèse de la vitamine B12 (ou cobalamine) et à la production de globules rouges. Les ions zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) font partie intégrante de plusieurs métalloprotéinases associées à des fonctions neurologiques, immunitaires ou encore dermatologiques, et jouent un rôle important dans la stabilisation de structure tertiaire de certaines protéines appelées « protéines à doigt de zinc », impliquées dans la régulation de l'expression de gènes. Les ions molybdène ( $\text{Mo}^{2+}$ ) sont des éléments importants du site actif de la xanthine oxydase et de l'aldéhyde oxydase, enzymes respectivement responsables du métabolisme de l'acide urique et de l'alcool. <sup>11-14</sup>

Par opposition à ces éléments essentiels pour notre organisme, d'autres tels que les ions arsenic ( $\text{As}^{3+}$ ), cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ), mercure ( $\text{Hg}^{2+}$ ) et plomb ( $\text{Pb}^{2+}$ ) sont connus pour exercer des effets toxiques tout en n'ayant aucun rôle biologique bénéfique. Ces métaux se lient à des sites

de liaison protéiques en déplaçant les métaux originellement liés, perturbant ainsi de nombreux processus métaboliques.<sup>15</sup> À cause de leur caractère carcinogène ainsi que de leur toxicité systémique aigüe et chronique, ils sont considérés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme faisant partie de la liste des dix produits chimiques extrêmement préoccupants pour la santé publique. De nombreuses sources de contamination ont été identifiées et font l'objet de mesures spécifiques prises par l'OMS.<sup>16-18</sup>

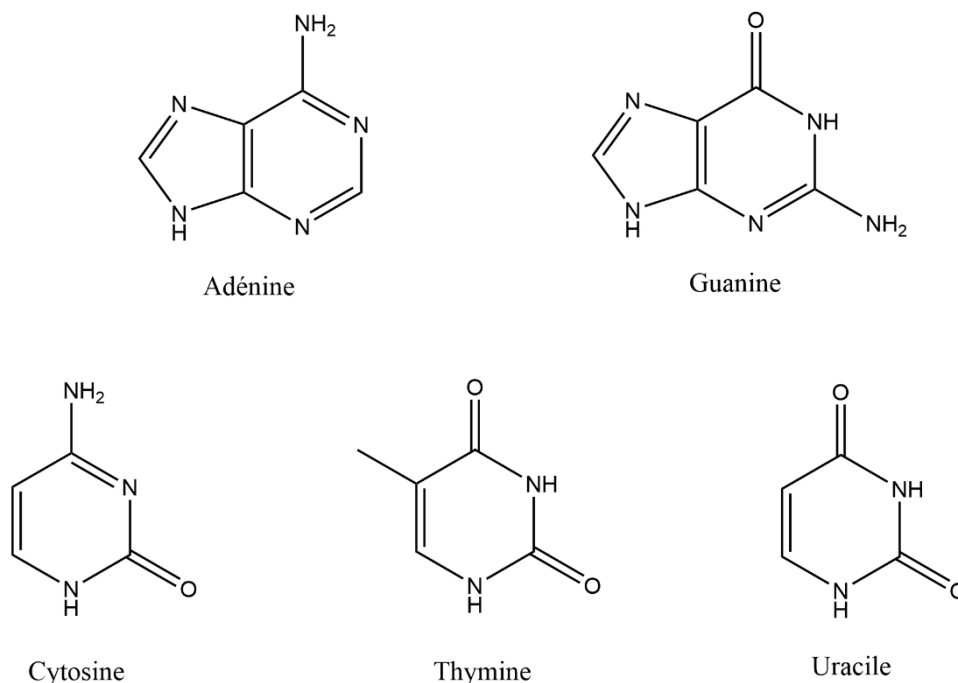
## 1.2. Interactions avec les acides nucléiques

### 1.2.1. Rappels sur les acides nucléiques<sup>19,20</sup>

Un acide nucléique est un polymère formé par une succession de molécules appelées nucléotides. On distingue deux types d'acides nucléiques :

- L'acide désoxyribonucléique (ADN) est le support de l'information génétique et compose l'ensemble du génome. La chaîne est constituée d'une succession de bases azotées de nature purique, l'adénine (A) et la guanine (G), et pyrimidique, la cytosine (C) et la thymine (T).

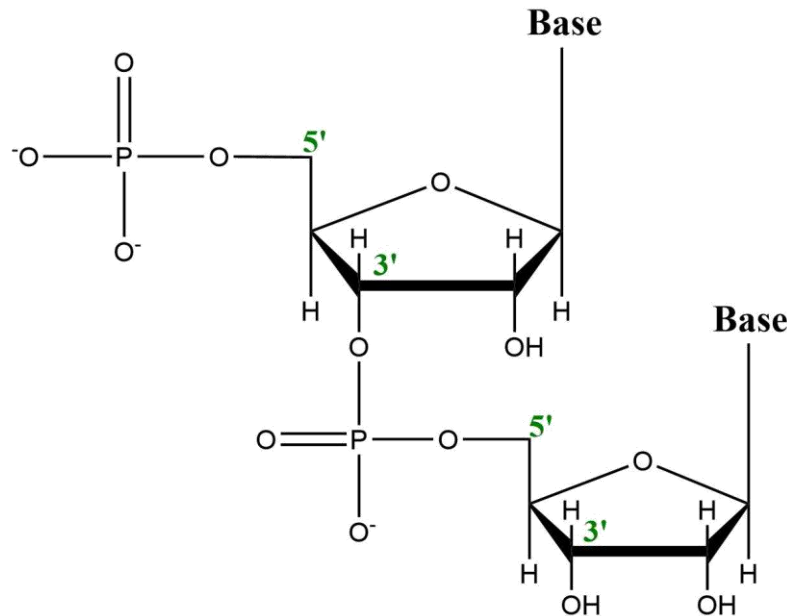
Elles sont présentées dans la Figure 3 ci-dessous.



**Figure 3.** Bases nucléiques retrouvées dans l'ADN et l'ARN.

Lorsque ces bases nucléiques sont liées à un sucre, le désoxyribose, l'unité résultante est appelée nucléoside.

Les nucléotides sont formés par l'association d'un nucléoside et d'un groupement phosphate. Ils sont reliés entre eux de façon covalente par des liaisons phosphodiester entre l'atome de carbone n°3 du sucre d'un premier nucléotide et l'atome de carbone n°5 du sucre d'un second nucléotide, tel que présenté dans la Figure 4.



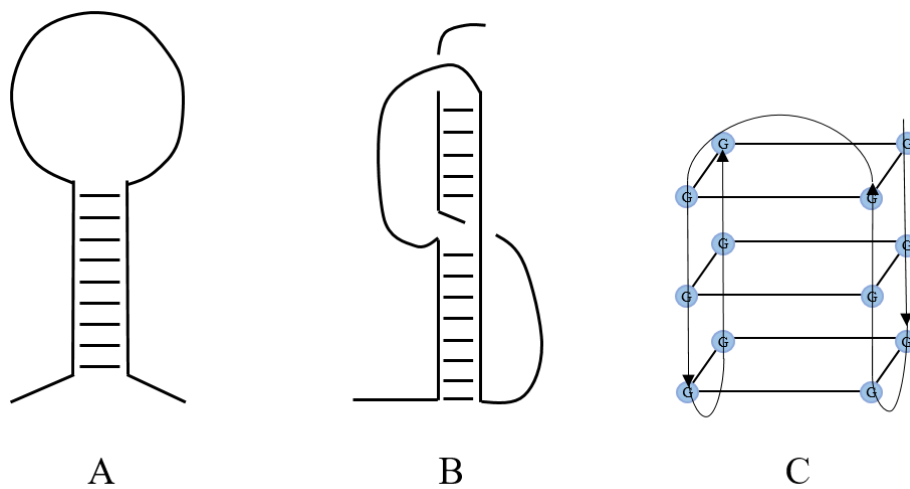
**Figure 4.** Représentation de deux nucléotides reliés par une liaison phosphodiester.

Dans les organismes vivants, l'ADN existe principalement sous forme bicaténaire. En effet, deux brins peuvent s'associer par complémentarité A-T et G-C *via* deux ou trois liaisons hydrogène respectivement. Cette association est appelée « appariement de Watson-Crick » et permet la formation d'une configuration en double hélice. Les bases azotées sont situées au centre tandis que les phosphates sont disposés à l'extérieur sous forme déprotonée, conférant à l'ADN une charge négative.

- L'acide ribonucléique (ARN) est constitué par les mêmes unités que l'ADN, à l'exception de la thymine qui est remplacée par l'uracile (U), une autre base pyrimidique (Figure 3). Le sucre utilisé pour former les nucléosides est le ribose, qui contient un groupement hydroxyle (-OH) en position 2.

Sur le plan fonctionnel, l'ARN est retrouvé généralement sous forme monocaténaire (simple brin) et courte. Il existe plusieurs types d'ARN tels que l'ARN messager (ARNm), l'ARN de transfert (ARNt), l'ARN ribosomique (ARNr) ou encore les micro-ARNs (miARN), qui remplissent de nombreuses fonctions biologiques dont la synthèse protéique.

Les acides nucléiques sont capables d'adopter plusieurs structures différentes. La structure primaire définit simplement la séquence de nucléotides. La structure secondaire correspond au repliement intracaténaire par le biais d'appariements internes entre bases complémentaires au sein d'une molécule simple brin, formant ainsi des motifs particuliers comme par exemple une tige-boucle ou « épingle à cheveux » (hairpin), ou un pseudonoeud. D'autres motifs tels que le G-quadruplex reposent sur des appariements particuliers de type « Hoogsteen », avec des interactions entre plusieurs guanines (Figure 5). La structure tertiaire, quant à elle, caractérise principalement la formation de la double hélice par appariements intercaténaux.



**Figure 5.** Exemples de structures secondaires d'acides nucléiques : tige-boucle (A), pseudonoeud (B) et G-quadruplex (C).

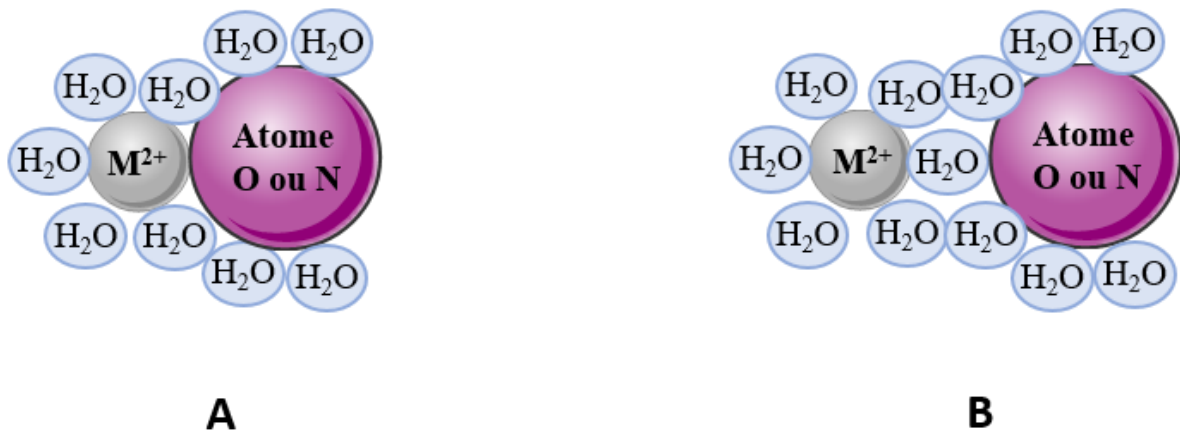
### 1.2.2. Types d'interaction

Il est établi depuis de nombreuses années que les ions métalliques sont capables d'interagir avec les acides nucléiques de diverses manières. Cette interaction revêt une importance physiologique majeure, car elle garantit le repliement correct des acides nucléiques, le maintien de leur structure secondaire et tertiaire, ainsi que leurs propriétés fonctionnelles.<sup>21-</sup>

23

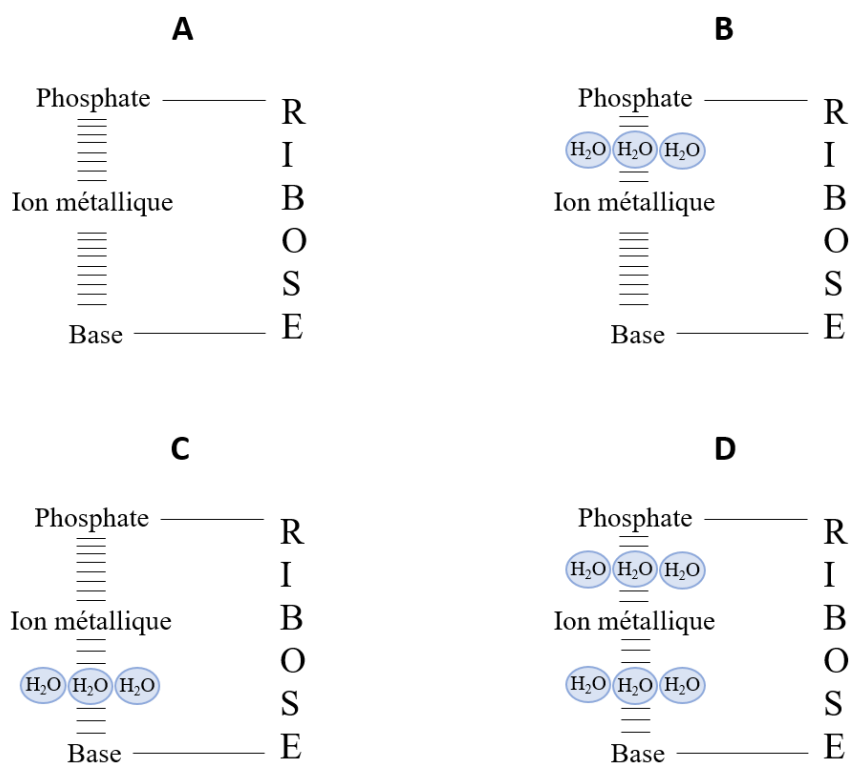
De par le caractère polyanionique de l'ADN, son principal mode d'interaction avec les cations métalliques se manifeste par des interactions non spécifiques rapides de nature électrostatique. Des interactions plus spécifiques peuvent se produire avec les groupements

phosphate et les bases nucléiques grâce à des liaisons de type « sphère externe » ou « sphère interne ». Ces liaisons de coordination s'effectuent principalement avec des atomes nucléophiles tels que l'azote et l'oxygène.<sup>6,24</sup> En solution aqueuse, les ions métalliques sont solvatés, formant une couche d'hydratation.<sup>13,23</sup> Lorsqu'une complexation en « sphère externe » se produit, des liaisons hydrogène s'établissent entre cette couche d'hydratation et un atome nucléophile faisant partie d'un groupement phosphate ou d'une nucléobase. D'autre part, la liaison en « sphère interne » s'effectue directement entre le cation métallique et l'atome nucléophile, en remplaçant une ou plusieurs molécules d'eau de la couche d'hydratation.<sup>6,13,25</sup> Ces deux types de liaison sont représentées dans la Figure 6.



**Figure 6.** Types d'interaction entre les ions métalliques et l'ADN : liaisons de type « sphère interne » (A) ; liaisons de type « sphère externe » (B). Adapté de Misra *et al.*<sup>25</sup>

Lorsqu'un cation métallique a la capacité d'établir plusieurs liaisons de coordination, il en résulte la formation d'un macrochélate. Ces derniers peuvent impliquer simultanément des liaisons en « sphère externe » et en « sphère interne », se formant aussi bien avec les groupements phosphate qu'avec les nucléobases.<sup>26</sup> La Figure 7 ci-dessous présente quatre schémas illustrant la formation de ces macrochélates.



**Figure 7.** Représentation simplifiée de quatre modèles de macrochélates. **A.** Liaisons en « sphère interne » avec un groupement phosphate et une nucléobase. **B.** Liaison en « sphère interne » avec une nucléobase, liaison en « sphère externe » avec un groupement phosphate. **C.** Liaison en « sphère interne » avec un groupement phosphate, liaison en « sphère externe » avec une nucléobase. **D.** Liaisons en « sphère externe » avec un groupement phosphate et une nucléobase. Adapté de Kazakov et Hecht.<sup>26</sup>

Selon plusieurs travaux, il semble que, pour un même cation métallique, les deux types de liaison de coordination peuvent coexister, dépendant de divers facteurs tels que la nature du cation, la séquence et la structure de l'acide nucléique, les conditions expérimentales ainsi que la base nucléique concernée.<sup>27</sup> Les ions métalliques de transition ont une propension à perdre facilement leur couche de solvation, ce qui facilite l'établissement de liaisons en « sphère interne » et se traduit par une affinité prononcée avec l'ADN.<sup>13,14</sup> À l'inverse, les ions alcalins ont tendance à former principalement des liaisons en « sphère externe », ce qui conduit à une plus faible interaction avec l'ADN.<sup>14</sup> Concernant les ions alcalino-terreux, ces derniers privilégient surtout des liaisons en « sphère interne ». Néanmoins, les ions  $Mg^{2+}$  sont capables

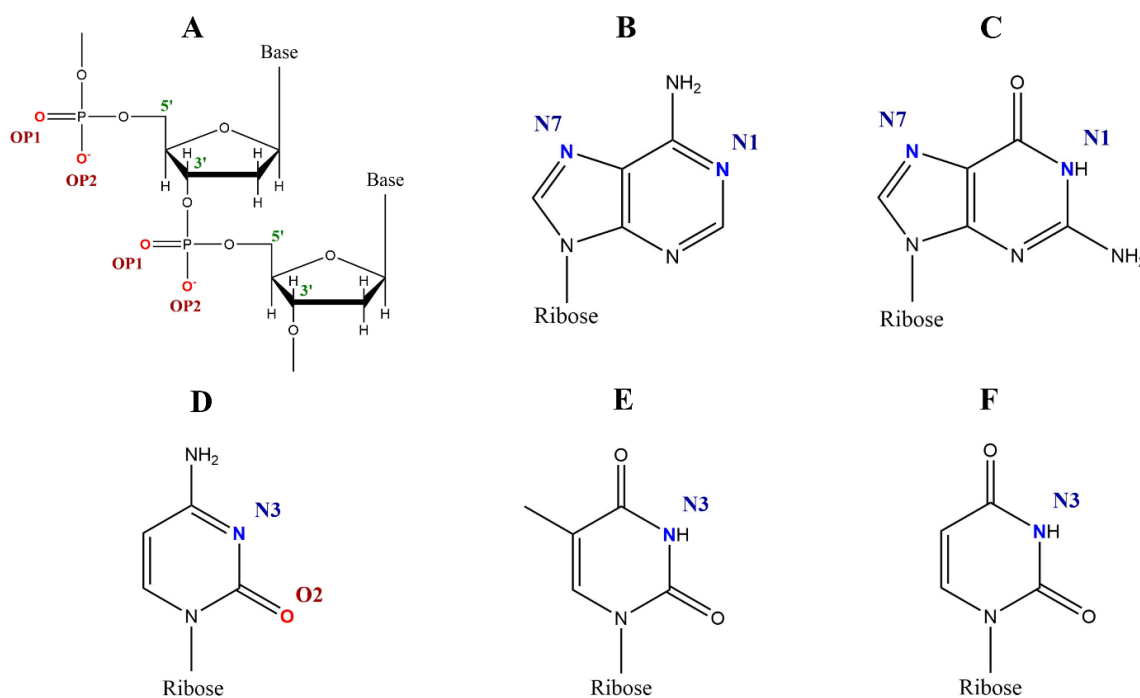


de former à la fois des liaisons en « sphère externe » et en « sphère interne » avec les groupements phosphate et les atomes nucléophiles des bases nucléiques.<sup>13,14,27–30</sup> Dans le cas des ions  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ , des liaisons en « sphère externe » semblent se former lors de l'interaction avec un polycytidylate, tandis que des liaisons en « sphère interne » semblent privilégiées en présence d'un polyadénylate.<sup>22</sup>

Du fait de la versatilité notable de ces interactions, il apparaît donc complexe d'attribuer un mode de liaison précis à chaque cation métallique.

Plusieurs études ont identifié les sites de fixation préférentiels des ions métalliques sur l'ADN (Figure 8).<sup>6,13,14,31</sup> En milieu neutre, les principaux sites de liaison sont généralement les atomes d'oxygène des groupements phosphate terminaux et internucléotidiques, l'atome d'azote en position 7 de la guanosine (N7), l'atome d'azote en position 3 de la cytidine (N3) et les atomes d'azotes en position 1 et 7 de l'adénosine (N1 et N7). L'atome d'oxygène en position 2 de la cytidine (O2) est également décrit comme un site de fixation important.

Dans certaines circonstances, en milieu basique à pH supérieur au pKa des bases (environ 10), lorsque celles-ci se retrouvent à l'état déprotoné, des atomes spécifiques peuvent également devenir des sites de liaison privilégiés, tels que l'atome d'azote en position 1 de la guanosine (N1) et les atomes d'azote en position 3 de l'uridine et de la thymidine (N3).<sup>6</sup>



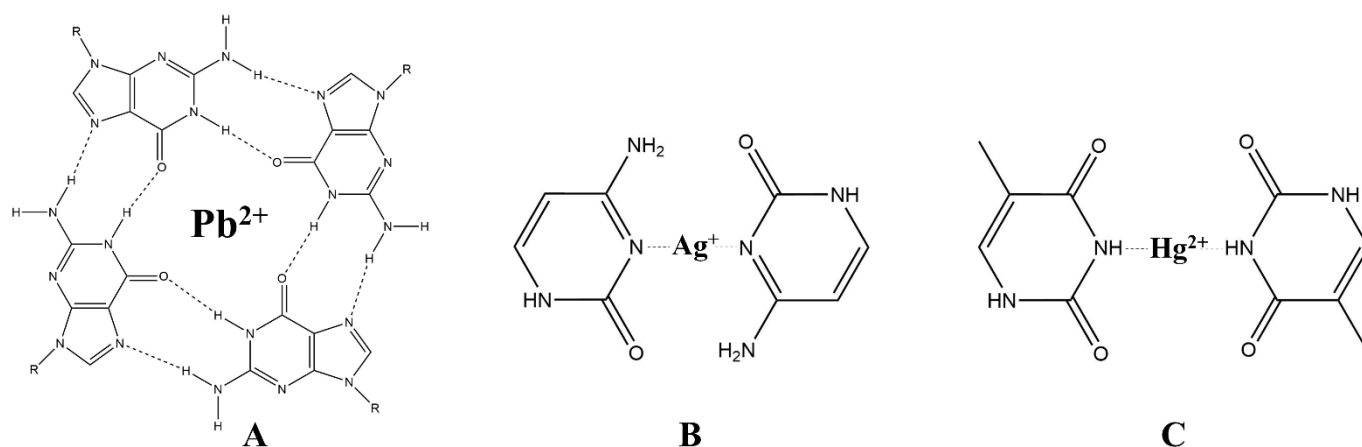
**Figure 8.** Sites de fixation préférentiels des ions métalliques sur l'ADN. **A.** Phosphates terminaux et internucléotidiques (OP1 et OP2). **B.** Adénosine (N1 et N7). **C.** Guanosine (N1 et N7). **D.** Cytidine (N3 et O2). **E.** Thymidine (N3). **F.** Uridine (N3).

### 1.2.3. Impact sur les acides nucléiques

Ces interactions affectent la structure et la conformation des acides nucléiques selon plusieurs paramètres, tels que la nature des ions métalliques. En effet, leur taille, leur charge, leur affinité envers les bases nucléiques et les phosphates ainsi que leur cinétique d'échange de ligands sont des propriétés à prendre en compte.<sup>6,14,24</sup> Par exemple, les ions platine ( $\text{Pt}^{2+}$ ) et chromium ( $\text{Cr}^{3+}$ ) présentent une faible cinétique d'échange de ligands, conduisant à une liaison quasi-irréversible avec l'ADN.<sup>13</sup>

La nature et la structure des acides nucléiques constituent également des facteurs importants. Certains mécanismes de liaison spécifiques ont été observés et sont illustrés dans la Figure 9. Les structures secondaires de type G-quadruplex sont capables de fixer de manière significative les ions  $\text{K}^+$  ou  $\text{Pb}^{2+}$ , assurant ainsi leur stabilisation. Les ions  $\text{Hg}^{2+}$  présentent une affinité importante vis-à-vis de la thymine, et les ions  $\text{Ag}^+$  peuvent interagir fortement avec les cytosines.<sup>13,32</sup>

Les conditions expérimentales jouent également un rôle fondamental, notamment la force ionique et le pH.<sup>23,33,34</sup> En effet, un pH optimal compris entre 6,5 et 7,5 est usuellement recommandé en raison de la formation de précipités en milieu basique.<sup>35,36</sup> La présence des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  servirait également de protection contre la fixation de cations divalents sur l'ADN de par la création d'une barrière électrostatique.<sup>6,13</sup>



**Figure 9.** Mécanismes de liaison spécifique entre les acides nucléiques et les ions métalliques. **A.** Interaction entre  $\text{Pb}^{2+}$  et un G-quartet (unité formant un G-quadruplex). **B.** Interaction entre  $\text{Ag}^+$  et deux cytosines. **C.** Interaction entre  $\text{Hg}^{2+}$  et deux thymines.



## **2. Les aptamères**

### **2.1. Généralités**

Les oligonucléotides sont de courtes séquences de quelques dizaines de nucléotides, synthétisées en laboratoire sous forme de simple brin, en série ADN ou ARN. L'ordre des nucléotides peut être préalablement établi de façon à obtenir une sonde capable de s'hybrider avec une séquence complémentaire ou de reconnaître un ligand précis. Leur obtention par voie synthétique permet de les fonctionnaliser en incorporant divers groupements tels que des amines ou des thiols, ou encore des molécules comme la biotine. De plus, il est possible de les marquer avec une molécule radioactive ou fluorescente.<sup>40</sup>

Les techniques d'hybridation d'acides nucléiques dans le cadre du développement de biocapteurs ou de méthodes d'analyse telles que la PCR ou les puces à ADN ont connu un essor considérable au cours des dernières décennies, motivant l'automatisation de la synthèse d'oligonucléotides.

En 1990, Ellington et Szostak ainsi que Tuerk et Gold ont fait état de la découverte d'oligonucléotides synthétiques monocaténaire particuliers. Baptisés « aptamères », du latin *aptus* signifiant « s'adapter » et du suffixe grec -méros signifiant « partie », ces derniers se distinguent par une affinité et une spécificité de liaison élevées envers une cible donnée.<sup>41,42</sup>

L'une des principales caractéristiques des aptamères réside dans leur capacité à reconnaître un large panel de ligands.<sup>4,43</sup> Selon une revue de la littérature entre 1990 et 2013 effectuée par McKeague *et al.*, 58% des aptamères décrits sont dirigés contre des protéines et 25% contre des petites molécules.<sup>44</sup> Les protéines ciblées peuvent inclure des enzymes,<sup>45,46</sup> des biomarqueurs de certains cancers,<sup>47,48</sup> ainsi que des facteurs de croissance.<sup>49,50</sup> Les petites molécules sont définies par une masse molaire inférieure à 1000 g/mol.<sup>51</sup> Des aptamères ont été sélectionnés pour cibler différentes familles de molécules appartenant à cette catégorie, telles que les nucléotides et nucléosides,<sup>52</sup> les toxines,<sup>53-55</sup> les acides aminés et dérivés,<sup>56-59</sup> les drogues,<sup>60,61</sup> les médicaments,<sup>62-65</sup> les pesticides,<sup>66,67</sup> ou encore les hormones non-peptidiques.<sup>68-70</sup> Les peptides constituent également des cibles potentielles,<sup>71-73</sup> tout comme certains ions métalliques ou métalloïdes.<sup>74-77</sup> En outre, des entités plus volumineuses telles que des particules virales,<sup>78-81</sup> des micro-organismes comme les bactéries,<sup>82-85</sup> les parasites<sup>86-88</sup> ou encore les spores fongiques,<sup>89</sup> ainsi que des cellules humaines<sup>90-93</sup> voire même des tissus<sup>94-96</sup>, ont également été

étudiées. Le Tableau 2 ci-dessous présente quelques exemples de cibles contre lesquelles des aptamères ont été sélectionnés.

**Tableau 2.** Exemples de ligands ciblés par des aptamères.

Type de cible	Exemples	Année	Référence
Protéines	<u>Enzymes :</u>		
	- Thrombine	1994	46
	- Phospholipase A2	1998	45
	<u>Biomarqueurs de cancers :</u>		
	- Antigène carcino-embryonnaire	2007	47
	- Alpha-foetoprotéine	2012	48
	<u>Facteurs de croissance :</u>		
	- FGF	1993	50
	- PDGF	1996	49
	Petites molécules	<u>Nucléotides et nucléosides :</u>	
- Adénosine triphosphate (ATP) et Adénosine		1995	52
<u>Toxines :</u>			
- Ochratoxine A (OTA)		2008	54
- Saxitoxine		2013	55
- Aflatoxine B1 (AFB1)		2014	53
<u>Acides aminés et dérivés :</u>			
- L-Arginine		1996	57
- Dopamine		1997	59
- L-tyrosinamide		2001	56
- Sérotonine		2018	58
<u>Drogues :</u>			
- Cocaïne		2001	60
- Métamphétamine		2013	61
<u>Médicaments :</u>			
- Théophylline		1994	64
- Aminosides		1995	63
- Tétracyclines		2008	62
- Digoxine	2012	65	
<u>Pesticides :</u>			
- Tébuconazole et Inabenfide	2014	66	
- Bromacil	2014	67	
<u>Hormones non-peptidiques :</u>			
- Estradiol	2007	69	
- Progestérone	2015	70	
- Testostérone	2017	68	
Peptides	- Substance P	1995	73
	- Vasopressine	1997	71
	- Peptide $\beta$ -amyloïde	2002	72

Ions métalliques et métalloïdes	- Arsenic (As <sup>3+</sup> )	2009	74
	- Cadmium (Cd <sup>2+</sup> )	2014	75
	- Palladium (Pd <sup>2+</sup> )	2015	77
	- Plomb (Pb <sup>2+</sup> )	2018	76
Particules virales	- VHB	2011	79
	- Ebola	2013	80
	- Virus de la dengue	2015	81
	- SARS-CoV-2	2020	78
Micro-organismes	<u>Bactéries :</u>		
	- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	2007	85
	- <i>Staphylococcus aureus</i>	2009	84
	- <i>Escherichia coli</i> O157:H7	2012	82
	- <i>Listeria monocytogenes</i>	2013	83
	<u>Parasites :</u>		
	- <i>Trypanosoma cruzi</i>	2002	88
	- <i>Leishmania infantum</i>	2007	87
	- <i>Plasmodium falciparum</i>	2016	86
	<u>Champignons :</u>		
- Spores aspergillaires	2021	89	
Cellules humaines	- Cellules de glioblastome	2001	93
	- Cellules de leucémie aiguë lymphoblastique	2006	91
	- Cellules de lymphome de Burkitt	2007	92
	- Cellules de carcinomes	2013	90
Tissus	- Tissu de cancer du sein	2009	95
	- Tissu de carcinome papillaire thyroïdien	2019	96
	- Tissu de cancer hépatique	2021	94

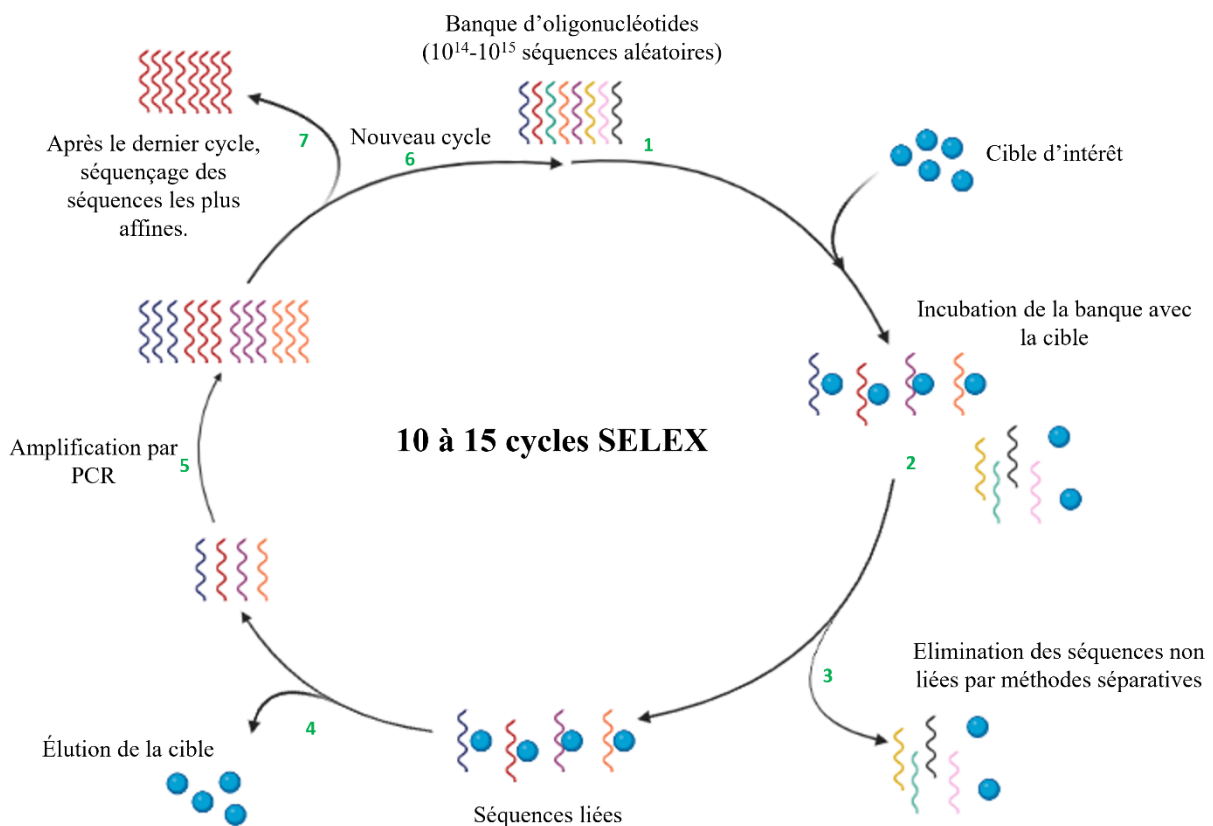
La reconnaissance de la cible par l'aptamère s'effectue par le biais de multiples points de contact impliquant des interactions électrostatiques et de « stacking », des liaisons hydrogène ainsi que des effets stériques. Une protéine est souvent reconnue en surface tandis qu'une petite molécule se loge généralement dans une cavité située au cœur de l'aptamère, qui est capable de s'ajuster à sa cible en effectuant des repliements successifs.<sup>97</sup>

## 2.2. Production des aptamères

Les aptamères sont sélectionnés par une procédure *in vitro* appelée SELEX, mise au point en 1990 par Tuerk et Gold,<sup>42</sup> et dont le fonctionnement est représenté dans la Figure 11. La première étape consiste à incuber une banque d'oligonucléotides contenant un grand nombre de séquences aléatoires (généralement de l'ordre de 10<sup>14</sup> à 10<sup>15</sup>) avec une cible d'intérêt dans des conditions opératoires préalablement définies. Grâce à la diversité conséquente de cette

banque, seule une petite partie des séquences sont capables de reconnaître naturellement la cible avec une affinité plus ou moins importante. Les séquences affines, en vue de leur amplification par PCR, sont séparées des séquences qui ne se lient pas à la cible principalement par des méthodes chromatographiques telles que la chromatographie d'affinité sur gel d'agarose, la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), ou à l'aide de billes magnétiques sur lesquelles la cible aura été préalablement immobilisée. Les candidats aptamères amplifiés sont ensuite soumis à un nouveau cycle SELEX, réalisé dans des conditions plus stringentes. Entre 10 et 15 cycles sont généralement nécessaires pour obtenir des séquences ayant une affinité satisfaisante pour la cible d'intérêt. Au terme du dernier cycle, les séquences les plus affines sont caractérisées par séquençage.<sup>4,44</sup>

Les aptamères isolés contiennent généralement 70 à 80 nucléotides et peuvent être tronqués pour ne conserver que la région responsable de l'interaction avec la cible, ou pour faciliter leur repliement en une structure favorisant cette interaction.<sup>4</sup> La longueur minimale de liaison d'un aptamère se situe généralement entre 25 à 40 nucléotides, avec un poids moléculaire d'environ 8 à 13 kDa.<sup>4,98</sup>

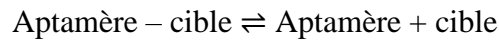


**Figure 11.** Les différentes étapes de la méthode SELEX.

Selon la cible d'intérêt et l'application désirée, d'autres modes de SELEX peuvent être utilisés, qui diffèrent de la méthode SELEX conventionnelle par le mode de séparation des séquences affines et non affines, ou bien par le mécanisme de reconnaissance de la cible. Parmi eux, certains tels que la capture-SELEX, la CE-SELEX (CE pour électrophorèse capillaire) ou encore la « graphène oxide » (GO)-SELEX peuvent être employés pour surmonter les difficultés rencontrées lors de la sélection d'aptamères dirigés contre des petites molécules. En effet, la méthode SELEX conventionnelle nécessite généralement l'immobilisation des ligands sur une matrice solide. Or, cette méthode est peu adaptée pour les petites molécules, dont le greffage s'avère fastidieux en raison du manque de groupements fonctionnels. Cette situation peut entraîner une gêne stérique, conduisant à un manque d'accessibilité de la cible aux aptamères. De plus, il existe un risque de modification de ses propriétés de reconnaissance comparativement à la forme libre lorsque celle-ci est conjuguée à un espaceur pour son immobilisation.<sup>3,99</sup> La capture-SELEX consiste à conjuguer la banque d'oligonucléotides à des billes magnétiques *via* des séquences d'ancrage situées à leurs extrémités. Un changement conformationnel se produit lors de la reconnaissance de la cible, entraînant le déplacement des séquences affines de la surface de la matrice.<sup>100</sup> La GO-SELEX est une autre méthode exploitant la propriété de l'oxyde de graphène à adsorber l'ADN simple brin par le biais d'interactions  $\pi$ - $\pi$ . De cette manière, les séquences non liées à la cible d'intérêt peuvent être facilement séparées des séquences liées par simple centrifugation.<sup>101</sup> La CE-SELEX quant à elle, permet de réduire le nombre de cycles (de 1 à 4, en général), améliorant ainsi la rapidité de la sélection. La séparation des complexes aptamère-cible s'effectue selon la mobilité électrophorétique sous l'action d'un champ électrique.<sup>102</sup> Cette technique est notamment développée au sein de notre laboratoire et a été employée pour la sélection d'aptamères dirigés contre un peptide, la conotoxine,<sup>103</sup> et contre la protéine Tau.<sup>104</sup> Elle n'est cependant pas adaptée à la sélection d'aptamères dirigés contre les petites molécules en raison de la très faible voire l'absence de différence de mobilité entre la banque libre et les complexes aptamère-cible.<sup>3</sup> Un autre mode couramment utilisé pour la sélection d'aptamères dirigés contre des cellules entières est la Cell-SELEX. Cette méthode implique l'interaction de la banque d'oligonucléotides avec de multiples biomarqueurs exposés à la surface des cellules, donnant lieu à une variété d'aptamères reconnaissant différents marqueurs membranaires sur une cellule donnée. Cette approche a permis la sélection d'aptamères dirigés contre les spermatozoïdes ou contre les érythrocytes, avec des applications en science médico-légale.<sup>99</sup>



À la fin du processus de SELEX, l'objectif est, en général, de choisir la ou les séquences d'aptamères présentant le meilleur profil d'affinité vis-à-vis du ligand. Celle-ci est exprimée par la constante de dissociation  $K_d$ , qui représente l'équilibre de la réaction :



$$K_d = \frac{[\text{Aptamère}] * [\text{Cible}]}{[\text{Aptamère} - \text{Cible}]}$$

D'après la formule ci-dessus, plus le  $K_d$  est faible, plus l'affinité d'un aptamère pour sa cible est importante. Sa détermination peut se faire par diverses méthodes de caractérisation des interactions. Parmi celles-ci figurent certaines méthodes spectroscopiques comme la mesure de l'intensité de fluorescence ou de l'anisotropie de fluorescence. Des techniques impliquant une variation de la masse apparente, telles que la résonance plasmonique de surface (SPR) ou les microbalances à cristal de quartz (QCM), sont également couramment utilisées, ainsi que des approches basées sur des variations du coefficient de diffusion comme la thermophorèse à micro-échelle (MST).<sup>3,105,106</sup>

Cependant, l'applicabilité de ces différentes méthodes représente un défi lorsque la cible est une petite molécule. En effet, la nécessité d'immobiliser ou de marquer la cible ou l'aptamère avec un fluorophore constitue une limitation importante à prendre en considération.<sup>99,105</sup> Comme souligné précédemment, ces procédés peuvent affecter la reconnaissance aptamère-cible et avoir un impact significatif sur l'affinité. De plus, un manque de sensibilité peut être constaté, soit en raison d'une variation de taille ou de masse trop minime, soit parce qu'un changement conformationnel substantiel de l'aptamère est requis.<sup>3,105</sup>

Afin de pallier ces problématiques, des méthodes opérant en phase homogène et sans nécessité de marquage sont également employées. Le titrage calorimétrique isotherme (ITC) exploite le dégagement de chaleur se produisant lors de l'interaction entre l'aptamère et sa cible, en mesurant la puissance requise pour maintenir des conditions isothermiques.<sup>107</sup> La principale contrainte réside dans le besoin de disposer de quantités importantes en cible en raison du  $K_d$  apparent généralement de l'ordre du  $\mu\text{M}$ .<sup>3,99</sup> Malgré cela, cette approche est couramment utilisée pour les systèmes aptamère-petites molécules.

L'électrophorèse capillaire (CE) est notamment adaptée pour l'étude des interactions entre aptamères et macromolécules. Une méthodologie a toutefois été développée afin d'appliquer cette technique aux petites cibles. Bao *et al.* ont ainsi décrit une approche basée sur l'électrophorèse capillaire cinétique (KCE), où la mesure des constantes cinétiques  $k_{\text{on}}$  et  $k_{\text{off}}$

permettent de calculer la constante de dissociation  $K_d$ .<sup>108</sup> L'aptamère est injecté en premier, suivi de la cible qui présente une mobilité plus importante. L'application du champ électrique conduit à la formation de complexes aptamère-cible, puis à la séparation des trois entités. En raison d'une différence de mobilité significative entre la cible seule et la cible liée à l'aptamère, la propagation temporelle de la cible est suivie par mesure de son absorbance en UV. Ce mode de détection évite ainsi le marquage fluorescent de l'aptamère ou de la cible.

La technique de « backscattering interferometry » (BSI) utilise un laser dont le faisceau est réfléchi et réfracté pour générer un profil constitué de plusieurs franges. La liaison aptamère-cible entraîne un changement de l'indice de réfraction, se traduisant par un changement de la position des franges au sein du motif. Le signal étant dépendant du changement conformationnel de l'aptamère, il est possible d'observer une sensibilité réduite.<sup>51,109</sup>

Le dichroïsme circulaire (CD) est une méthode spectroscopique reposant sur l'absorption de lumière polarisée circulairement, générant des profils spectraux distincts selon si l'aptamère est libre ou lié à sa cible. Cependant, une longueur d'onde d'absorption de la cible proche de celle de l'aptamère peut conduire à une résolution faible.<sup>106,107</sup> Cette technique est également très consommatrice de réactifs.

La dialyse à l'équilibre fait intervenir une membrane semi-perméable qui permet le passage exclusif des petits composés. Il convient de noter qu'une adsorption de la cible sur cette membrane peut se produire et altérer la mesure de l'affinité.<sup>105</sup>

Pour caractériser l'affinité d'un aptamère, il est ainsi recommandé d'utiliser plusieurs méthodes orthogonales pour compenser les limitations spécifiques de chacune d'entre elles. En outre, il est important de choisir des méthodes qui sont en adéquation avec l'application future envisagée pour l'aptamère concerné. La réalisation d'expérimentations supplémentaires visant à contrôler la spécificité de l'aptamère, en le testant avec une cible normalement non reconnue, et en testant une séquence aléatoire (« scramble ») avec la cible d'intérêt, est également cruciale pour valider les propriétés de reconnaissance de l'aptamère sélectionné.<sup>107,110–112</sup>

Le Tableau 3 répertorie de manière non exhaustive les différentes méthodes couramment employées pour déterminer l'affinité, en précisant leurs avantages et leurs limites liées à leur applicabilité vis-à-vis des cibles de faible poids moléculaire.

**Tableau 3.** Caractéristiques de certaines méthodes de détermination de l'affinité pour les petites molécules.

Méthode	Principe	Avantages	Limites
Anisotropie de fluorescence	Analyse de la lumière polarisée émise dépendante de la masse apparente et du mouvement du fluorophore.	- Rapidité - Phase homogène	- <u>Marquage fluorescent de la cible</u> : difficile - <u>Marquage fluorescent de l'aptamère</u> : nécessite un changement conformationnel significatif (manque de sensibilité)
SPR	Changement de l'indice de réfraction d'une source lumineuse sur une surface d'or lors de la liaison aptamère-cible.	- Sans marquage - Rapidité - Petits volumes	- <u>Immobilisation de la cible</u> : difficile et réduit l'affinité. - <u>Immobilisation de l'aptamère</u> : variation de masse apparente peu marquée (manque de sensibilité).
QCM	Changement des propriétés vibrationnelles d'un cristal lors de la liaison aptamère-cible.	- Sans marquage - Possibilité de suivre l'énergie de dissipation pour améliorer la sensibilité.	- <u>Immobilisation de la cible</u> : difficile et réduit l'affinité. - <u>Immobilisation de l'aptamère</u> : variation de masse apparente peu significative (manque de sensibilité).
MST	Différence de thermophorèse entre l'aptamère libre et les complexes aptamère-cible.	- Petits volumes - Rapidité - Phase homogène	- <u>Marquage fluorescent de la cible</u> : difficile et réduit l'affinité. - <u>Marquage fluorescent de l'aptamère</u> : la liaison avec la cible doit induire des modifications significatives au niveau de la charge ou de la sphère d'hydratation pour observer une différence de migration.
ITC	Dégagement de chaleur lors de la liaison aptamère-cible.	- Sans marquage - Phase homogène	- Nécessite des concentrations élevées en cible.
Électrophorèse capillaire cinétique (KCE)	Séparation de la cible libre, de l'aptamère libre et des complexes aptamère-cible selon leur mobilité électrophorétique.	- Sans marquage (détection UV) - Petits volumes - Rapidité - Phase homogène	- Nécessite des concentrations élevées en cible.

BSI	Différence de profils suite au changement de l'indice de réfraction d'un laser lors de la liaison aptamère-cible.	- Sans marquage - Phase homogène - Petits volumes	- Nécessite un changement conformationnel significatif
CD	Absorption de lumière polarisée circulairement. Changement du spectre lors de la liaison aptamère-cible.	- Sans marquage - Phase homogène	- Nécessite un changement conformationnel significatif. - Résolution faible. - Très consommateur en réactifs
Dialyse à l'équilibre	Membrane semi-perméable ne laissant passer que les petits composés.	- Simplicité - Rapidité	- Adsorption possible sur la membrane.

### 2.3. Avantages des aptamères

Souvent considérés comme des « anticorps synthétiques », les aptamères présentent de nombreux avantages par rapport à ces derniers. Leur synthèse est plus facile et plus rapide avec des possibilités de modifications chimiques et de fonctionnalisation plus flexibles. Ils présentent également une meilleure stabilité, des propriétés de stockage plus avantageuses, et leur dénaturation est réversible. De plus, leur synthèse *in vitro* réduit les préoccupations éthiques associées à la production des anticorps. Enfin, leur coût de production est généralement plus faible que celui des anticorps traditionnellement utilisés dans le cadre d'immunodosages.<sup>4,113</sup> Le Tableau 4 résume les principales caractéristiques des aptamères en comparaison avec les anticorps conventionnels.<sup>97,114,115</sup>

**Tableau 4.** Avantages des aptamères par rapport aux anticorps conventionnels.

	<b>Anticorps conventionnel</b>	<b>Aptamère</b>
<b>Synthèse</b>	<i>In vivo</i> (animal), processus biologique	<i>In vitro</i> , processus chimique
<b>Coût de production</b>	Élevé	Réduit
<b>Temps de production</b>	Long : environ 6 mois	Court : entre 2 et 8 semaines
<b>Taille</b>	Environ 150 kDa	Entre 13 et 26 kDa
<b>Cibles</b>	Immunogéniques	Tout type
<b>Reconnaissance de la cible</b>	En conditions physiologiques	Conditions adaptables
<b>Variation inter-lot</b>	Élevée	Faible
<b>Modifications et fonctionnalisation</b>	S'effectuent à des positions aléatoires	Peuvent être introduites à des positions définies
<b>Stabilité</b>	Sensible à la température Dénaturation irréversible	Thermostables Dénaturation réversible
<b>Durée de conservation</b>	Limitée	Longue

## 2.4. Applications des aptamères

### 2.4.1. En thérapie et vectorisation

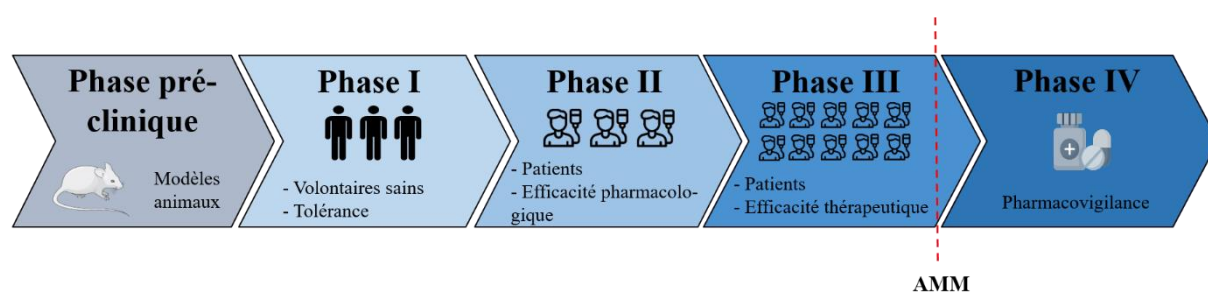
Peu de temps après leur découverte, une première étude a été publiée par Sullenger *et al.*,<sup>116</sup> démontrant la capacité d'un aptamère à réduire la réplication virale du VIH, ouvrant la voie à leur utilisation potentielle dans le domaine thérapeutique. En plus des avantages mentionnés dans le Tableau 4, ces derniers présentent une meilleure pénétration cellulaire que les anticorps, ainsi qu'une faible immunogénicité et une toxicité réduite.<sup>113</sup> Néanmoins, l'utilisation thérapeutique des aptamères présente certaines limites qui méritent d'être soulignées. En raison de leur petite taille, ils présentent une demi-vie très courte (environ 5 à 10 minutes) dans l'organisme et sont rapidement éliminés par voie rénale. Cependant, il est possible de prolonger cette demi-vie à une période allant de 24 à 48 heures en conjuguant l'aptamère avec une molécule plus volumineuse telle que le polyéthylène glycol (PEG) ou le

cholestérol.<sup>115,117</sup> De plus, leur dégradation par des nucléases constitue un autre inconvénient majeur, pouvant être toutefois surmonté grâce à des modifications chimiques au niveau du sucre des bases pyrimidiques, en substituant le groupement 2'-OH en 2'-F, 2'-NH<sub>2</sub> ou 2'-OCH<sub>3</sub>.<sup>115,117</sup> La modification des liaisons phosphodiester en liaisons phosphorothioate ou méthylphosphonate constitue également un moyen de résistance aux nucléases.<sup>115,117</sup> Une autre solution consiste à utiliser des spiegelmers, qui sont la forme énantiomérique des aptamères et qui utilisent le L-ribose au lieu du D-ribose. Ces derniers ne sont pas reconnus par les nucléases, offrant ainsi une alternative prometteuse.<sup>117,118</sup> Enfin, une perte d'affinité peut être observée dans les environnements complexes, notamment dans des milieux à température élevée, en présence de divers ions métalliques, ou lorsque le pH est supérieur au pKa de la cible. En effet, la liaison aptamère-cible est améliorée lorsqu'elle se trouve à l'état protoné.<sup>119-121</sup> Généralement, cette affinité peut être améliorée par la modification de bases nucléiques.<sup>117</sup> À titre d'exemple, les SOMAmers (« slow off-rate modified aptamers ») développés par la société SomaLogic ont permis le développement d'aptamères de meilleure affinité grâce à l'ajout de groupements fonctionnels similaires à des chaînes latérales d'acides aminés.<sup>122</sup>

En 2004, le pegaptanib (Macugen<sup>®</sup>) est devenu le premier aptamère thérapeutique à être approuvé par la « Food and Drug Administration » (FDA) aux États-Unis. Il s'agit d'un aptamère à base d'ARN ciblant le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), indiqué dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) exsudative. Son mode d'action est qualifié d'antagoniste car il se lie au VEGF afin d'empêcher sa liaison avec son récepteur.<sup>123</sup> Son autorisation de mise sur le marché (AMM) européenne a été obtenue en 2006, et son remboursement en France a été assuré jusqu'en 2014, où le service médical rendu (SMR) a été jugé insuffisant. En effet, les anti-VEGF les plus récents tels que le ranibizumab (un anticorps monoclonal) ou l'aflibercept (une protéine de fusion) ont démontré une amélioration de l'acuité visuelle tandis que le pegaptanib permettait seulement de diminuer la perte d'acuité visuelle. Par conséquent, selon la Haute Autorité de Santé (HAS), ce médicament n'est plus considéré comme une option appropriée pour la prise en charge de la DMLA exsudative.<sup>124</sup>

En août 2023, un deuxième aptamère thérapeutique en série ARN, dénommé avacincaptad pegol (Izervay<sup>®</sup>), a été approuvé par la FDA. Ce dernier est dirigé contre le facteur C5 du complément et agit selon un mode antagoniste. Il est indiqué dans le traitement de l'atrophie géographique, une conséquence à long-terme de la DMLA atrophique.<sup>125</sup>

À ce jour, une douzaine d'aptamères font l'objet d'essais cliniques dans divers domaines tels que l'ophtalmologie, les troubles de la coagulation, l'oncologie ainsi que l'inflammation. L'évaluation de l'efficacité et la tolérance d'un nouveau médicament chez des sujets humains implique différentes phases, dont les modalités sont résumées dans la Figure 12. La phase I vise à évaluer la tolérance du produit chez un petit nombre de volontaires sains. La phase II permet de déterminer l'efficacité pharmacologique chez un faible effectif de patients et d'établir les modalités optimales de prescription. La phase III consiste à évaluer l'efficacité thérapeutique de la molécule chez de larges populations de sujets atteints de la maladie ciblée. Enfin, la phase IV se déroule après l'obtention de l'AMM, et a pour objectif de surveiller l'utilisation à long-terme du médicament dans le cadre de la pharmacovigilance.<sup>126</sup>



**Figure 12.** Les différentes phases d'une étude clinique.

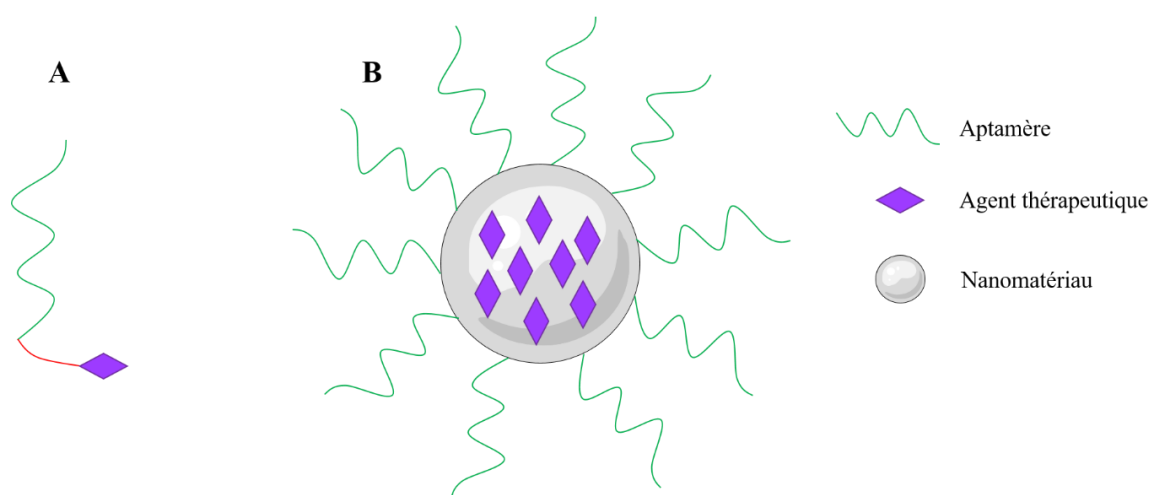
D'après le Tableau 5 ci-dessous, un candidat est actuellement en phase III, huit sont en phase II, et un seul se trouve en phase I.<sup>117,127</sup> Il est à noter qu'un essai de phase III pour l'aptamère REG1 a été interrompu prématurément en raison de l'apparition d'allergies sévères au PEG.<sup>118</sup>

**Tableau 5.** Aptamères en cours d'étude clinique.

Nom	Cible	Indication	Phase
Pegaptanib (Macugen <sup>®</sup> )	VEGF	DMLA exsudative	IV
Avacincaptad pegol (Izervay <sup>®</sup> )	C5 (Facteur du complément)	Atrophie géographique (DMLA atrophique)	IV
E10030 – Pegpleranib (Fovista <sup>®</sup> )	PDGF	DMLA	III
REG1	Facteur IXa	Maladie coronarienne	II
ARC1779	Facteur von Willebrand	Infarctus du myocarde	II
NU172	Thrombine	Maladie cardiaque	II

AS1411	Nucléoline	Leucémie aiguë myéloïde	II
NOX-A12 – Olaptased pegol	CXCL12 (chimiokine)	Leucémie lymphoïde chronique	II
NOX-E36 – Emapticap pegol (Spiegelmer)	CCL2 (chimiokine)	Diabète de type 2 (néphropathie diabétique)	II
NOX-H94 – Lexaptipid pegol (Spiegelmer)	Hepcidine	Anémie chronique	II
ApTOLL	TLR4	Accident vasculaire cérébral	II <sup>128</sup>
BAX499	TFPI	Hémophilie	I

En plus de leur activité thérapeutique propre, les aptamères offrent une approche prometteuse pour la vectorisation de médicaments. Comme illustré dans la Figure 13, cette vectorisation peut être réalisée de deux manières principales ; tout d’abord, il est possible de conjuguer directement une molécule thérapeutique à l’aptamère, permettant ainsi de délivrer l’agent thérapeutique de façon ciblée au niveau d’un site spécifique reconnu par l’aptamère. De plus, il est également possible de fonctionnaliser des nanomatériaux tels que des liposomes, des micelles, ou des nanoparticules, qui peuvent contenir une grande quantité de substance active.<sup>115,118,129</sup> Un exemple concret de cette approche est la vectorisation de la doxorubicine, un médicament anticancéreux, au niveau des cellules de la prostate. Cette stratégie permet d’augmenter l’efficacité thérapeutique tout en réduisant les effets indésirables systémiques.<sup>130</sup>



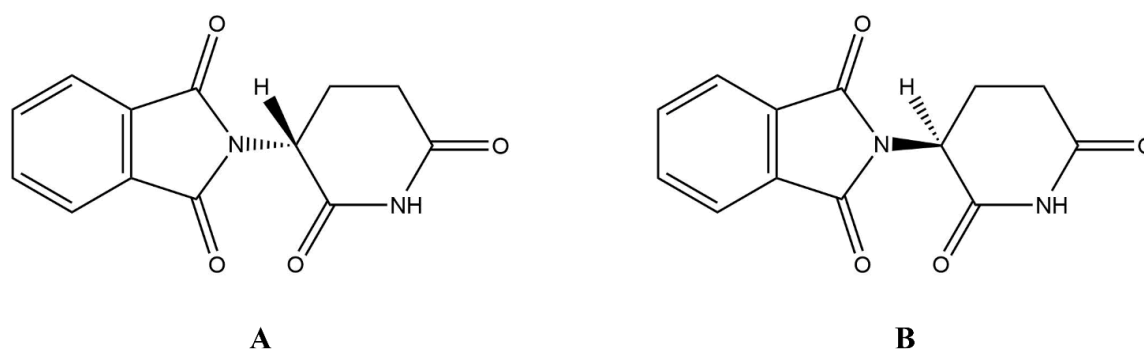
**Figure 13.** Procédés de vectorisation utilisant les aptamères. **A.** Conjugaison entre un aptamère et un agent thérapeutique. **B.** Fonctionnalisation d’un nanomatériau contenant l’agent thérapeutique.



### 2.4.2. En analyse et imagerie

Outre leurs applications thérapeutiques, les aptamères sont largement exploités dans le domaine de l'analyse. Au stade pré-analytique, de nombreuses publications soulignent leur utilité dans le prétraitement des échantillons, que ce soit pour l'extraction d'un composé d'intérêt<sup>131,132</sup> ou pour la séparation des différentes molécules présentes dans ces échantillons, en utilisant des méthodes chromatographiques ou électrophorétiques.<sup>133,134</sup> Ces approches font appel à des cartouches d'extraction ainsi qu'à des colonnes d'affinité au sein desquelles des aptamères spécifiques d'une cible d'intérêt sont immobilisés. Les aptamères, en raison de leur taille relativement faible, permettent une fixation plus dense à la surface de la phase stationnaire par rapport à d'autres ligands d'affinité tels que les anticorps. De plus, leur facilité de conjugaison sur ce type de support les rend particulièrement adaptés pour ce type d'application. En 2012, Penner et ses collaborateurs, de la société NeoVentures Biotechnology Inc., ont mis au point et commercialisé des colonnes d'affinité pour la purification d'échantillons contenant des mycotoxines carcinogènes, telles que l'ochratoxine A ou les aflatoxines.<sup>135,136</sup>

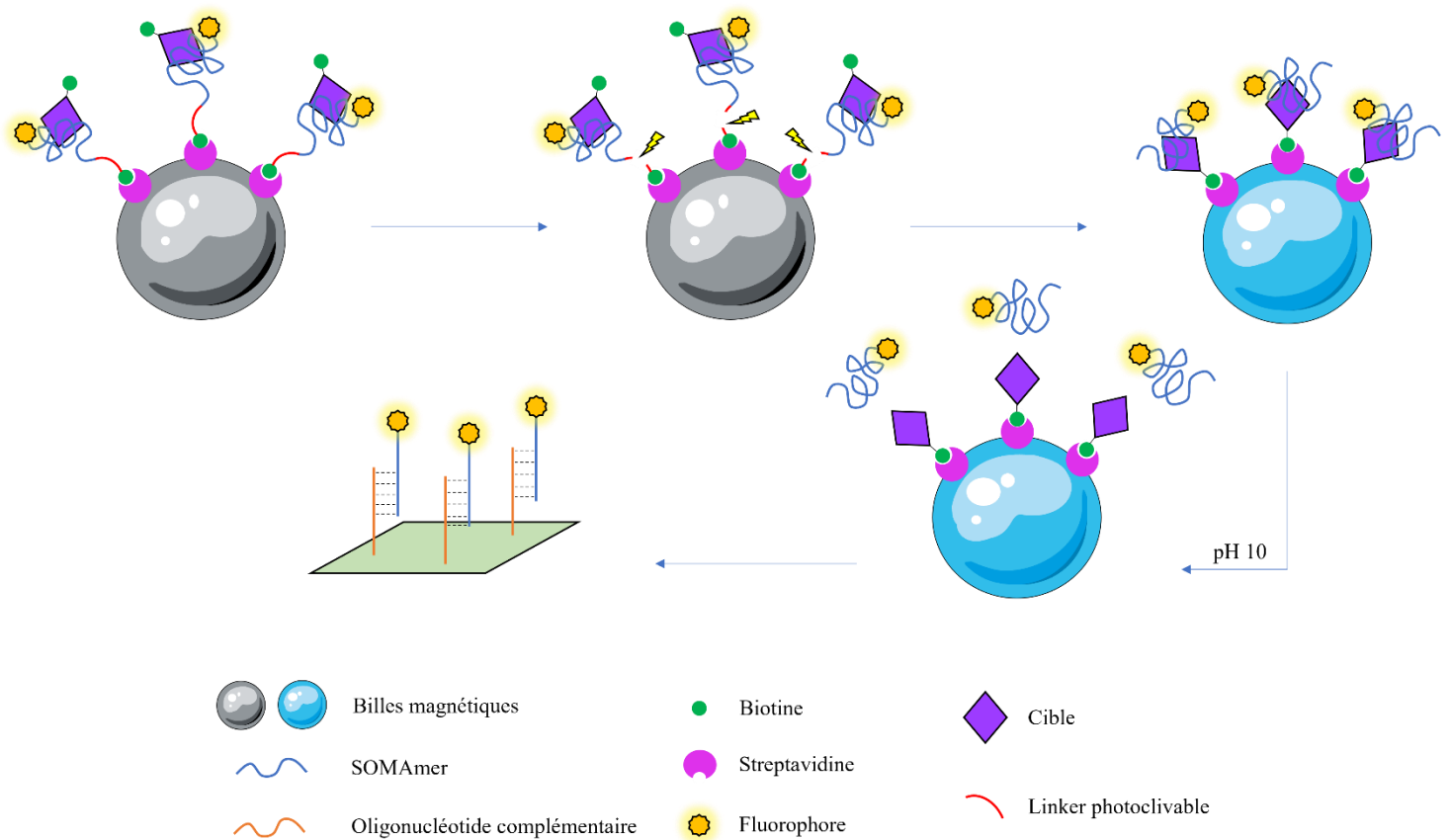
La séparation de molécules chirales suscite un intérêt croissant dans l'industrie pharmaceutique. En effet, de nombreux principes actifs existent sous la forme d'énantiomères, l'un porteur de l'activité thérapeutique, l'autre pouvant être inactif voire toxique.<sup>137</sup> Le thalidomide, médicament prescrit dans les années 1950 comme sédatif et antiémétique, a causé de nombreuses malformations congénitales en raison de la tératogénicité de l'énantiomère S (Figure 14). Ce scandale a incité les autorités sanitaires à imposer des contrôles rigoureux de la pureté énantiomérique d'un médicament avant sa mise sur le marché.<sup>138</sup> Les aptamères peuvent ainsi être utilisés en tant que sélecteurs chiraux. Notre laboratoire a été le premier à exploiter cette caractéristique en 2003, pour réaliser la séparation énantiosélective d'une molécule modèle, la vasopressine.<sup>139</sup> Depuis lors, plusieurs travaux ont été menés sur des acides aminés et dérivés,<sup>140-143</sup> des pesticides<sup>144</sup> ainsi que des médicaments.<sup>145,146</sup>



**Figure 14.** Formes énantiomères du thalidomide. **A.** (R)-thalidomide. **B.** (S)-thalidomide.

Au niveau analytique, les aptamères représentent des éléments de reconnaissance de choix pour l'élaboration de biocapteurs et de bioessais dans divers domaines. En médecine légale, ces derniers peuvent être utilisés pour la détection de substances illicites dans des échantillons biologiques, ainsi que pour l'identification d'empreintes digitales ou de taches de sang sur les scènes de crime.<sup>99,114</sup> Dans l'industrie agroalimentaire, ils sont employés pour la surveillance de la qualité des produits alimentaires et de la sécurité environnementale, en détectant la présence de contaminants indésirables tels que les métaux lourds, les biotoxines, les microorganismes pathogènes, les perturbateurs endocriniens ou les polluants chimiques.<sup>32,106,147,148</sup> Les aptamères ont également leur place dans le cadre de la lutte contre le terrorisme, par exemple pour la détection d'agents toxiques comme la ricine, les composés organophosphorés ou les spores de *Bacillus anthracis*, ainsi que de substances explosives volatiles telles que le trinitrotoluène (TNT) ou le cyclonite (RDX).<sup>99,147,149</sup> Enfin, l'élaboration de biocapteurs et de bioessais dans le domaine du diagnostic *in vitro* constitue un champ d'application non négligeable, où les aptamères sont utilisés pour la détection d'une variété de cibles impliquées dans diverses pathologies infectieuses, cardiovasculaires, cancéreuses ou encore neurologiques.<sup>129,150,151</sup>

À l'heure actuelle, la plupart de ces biocapteurs et bioessais demeurent généralement au stade de « preuve de concept ». Cependant, la société SomaLogic a développé en 2010 une plateforme de diagnostic appelée SOMAscan<sup>®</sup>, qui s'est avérée prometteuse pour l'analyse simultanée de plusieurs milliers de protéines dans des échantillons biologiques grâce à l'utilisation des SOMAmers.<sup>152,153</sup> Le principe est décrit dans la Figure 15 ; les SOMAmers employés sont pourvus d'un marqueur fluorescent en position 5' et sont attachés à des billes magnétiques *via* une biotine en position 3'. La cible, une fois reconnue, est ensuite biotinylée par une réaction de biotinylation des amines. S'ensuit une étape de photoclivage d'un linker situé entre le SOMAmer et la biotine, permettant la libération des complexes SOMAmer-cible. Ces derniers sont capturés par des billes fonctionnalisées avec de la streptavidine. Après une étape de dénaturation à pH 10, les SOMAmers sont libérés, collectés, puis détectés à l'aide d'une méthode d'hybridation utilisant des oligonucléotides complémentaires fixés sur une puce à ADN.<sup>154,155</sup>



**Figure 15.** Principe de la plateforme SOMAscan®.

Cet exemple a ouvert la voie vers la commercialisation de quelques dispositifs destinés à la détection biomoléculaire et au diagnostic *in vitro*, résumés dans le Tableau 6 ci-dessous.<sup>5,156–158</sup> Étant donné l'expansion croissante du marché des aptamères, de plus en plus de sociétés biotechnologiques se penchent sur la commercialisation de ce type de kits. Cependant, cela requiert l'existence de protocoles standardisés pour la sélection et la caractérisation des aptamères ainsi que la validation des méthodes en milieux biologiques.<sup>5,44</sup>

**Tableau 6.** Dispositifs commercialisés destinés à la détection et au diagnostic *in vitro*.

<b>Société</b>	<b>Produit</b>	<b>Année</b>	<b>Concept</b>
SomaLogic	SOMAscan®	2010	Plateforme de détection simultanée de plusieurs milliers de protéines.
NeoVentures Biotechnology	OTA-Sense® Afla-Sense®	2012	Kits de détection optique de mycotoxines dans des échantillons alimentaires. - Colonnes d'affinité (achetables séparément) - Plateforme de détection.
AptaGen	Apta-Beacon™	2012	Kit de détection optique de théophylline.
Sekisui Diagnostics GmbH	OLIGOBIND® OLIGOBIND® APC	2012	Kit de détection optique de thrombine ou de protéine C activée, dans des échantillons plasmatiques.
Aptamer Sciences (AptSci)	AptoPrep™	2014	Kit de détection optique de protéines ou de cellules exprimant certains biomarqueurs, dans des échantillons biologiques.
	AptoCyto™	2014	Kit d'isolation et de détection optique de cellules exprimant certains biomarqueurs, pour une analyse par cytométrie en flux.
	AptoDetect™-Lung	2018	Kit d'analyse de 7 protéines associées au risque de cancer du poumon, avec calcul d'un score.
CibusDx	APOLLOMER™	2018	Dispositif point-of-care (POC) de détection électrochimique de pathogènes et toxines dans des échantillons alimentaires et environnementaux.
Biogenes Technologies	AptSENS	2021	Dispositif POC de détection électrochimique du SARS-CoV-2.
Achiko	AptameX	2022	Kit de détection colorimétrique du SARS-CoV-2.
AptaMatrix	Alloswitch™	2023	Kit de détection optique de cibles biologiques.

De nombreuses applications dans le domaine de l'imagerie moléculaire *in vivo* sont également décrites dans la littérature.<sup>129,159</sup> L'utilisation d'un aptamère radiomarqué avec du <sup>99m</sup>Tc pour la visualisation de l'inflammation par tomographie par émission monophotonique (TEMP) a été mentionnée pour la première fois par Charlton *et al.* en 1997.<sup>160</sup> Hicke *et al.* ont également conçu un aptamère marqué avec du <sup>99m</sup>Tc pour détecter des cellules de glioblastome par reconnaissance de la ténascine C.<sup>161</sup> L'aptamère en question contient des bases 2'fluoropyrimidiques pour accroître sa stabilité face aux nucléases.

Quelques études ont répertorié l'usage d'autres techniques d'imagerie nucléaire telles que la tomographie par émission de positons (TEP) pour étudier des modèles de cancers. À titre d'exemple, Li *et al.* ont développé une sonde capable de cibler des cellules de cancer du poumon grâce à un aptamère dirigé contre la nucléoline et marqué avec du <sup>64</sup>Cu.<sup>162</sup>

Les aptamères peuvent également être associés à des produits de contraste à base de gadolinium, de nanoparticules métalliques ou de composés iodés afin d'être utilisés dans des techniques d'imagerie par résonance magnétique (IRM),<sup>163</sup> de tomodensitométrie<sup>164</sup> ou échographiques.<sup>165</sup> Enfin, l'emploi d'aptamères fluoromarqués constitue une approche intéressante pour l'observation de cellules spécifiques en ciblant des marqueurs exprimés à leur surface.<sup>150</sup> Plus de 50% des publications se concentrent sur l'imagerie par fluorescence, avec une majorité d'applications en oncologie.<sup>159</sup> Dans le domaine de la neurologie, Farrar *et al.* ont réussi à observer la présence de plaques amyloïdes chez la souris en utilisant un aptamère marqué par la fluorescéine qui se lie spécifiquement au peptide  $\beta$ -amyloïde, une molécule potentiellement impliquée dans la maladie d'Alzheimer.<sup>166</sup>

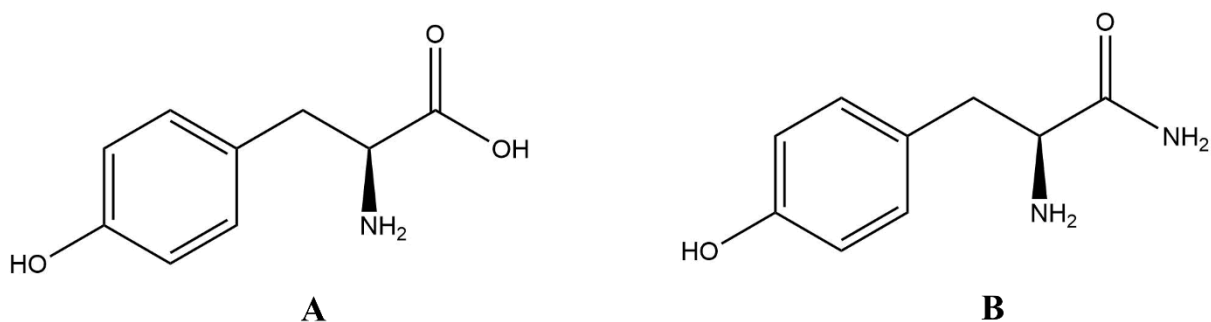
Certains travaux visent à développer des sondes multimodales qui combinent l'imagerie par fluorescence avec une technique plus globale parmi l'imagerie nucléaire, l'IRM ou la tomodensitométrie.<sup>159</sup>

Ces études, bien qu'encourageantes, nécessitent toutefois des investigations supplémentaires. Il est important d'évaluer l'affinité apparente de l'aptamère envers sa cible et de réaliser des comparaisons avec un contrôle négatif pour déterminer si le signal détecté provient véritablement de l'interaction aptamère-cible ou d'un processus non-spécifique d'interaction de la sonde avec la tumeur. De plus, il convient d'accorder une attention particulière à la dégradation *in vivo* des sondes et à leur toxicité. Bien que les aptamères soient régulièrement décrits comme peu immunogènes, ils peuvent être reconnus de manière auto-immune et par conséquent être à l'origine d'effets indésirables systémiques.<sup>159</sup>

## 2.5. Aptamères utilisés dans le cadre de la thèse

### 2.5.1 Aptamère anti-L-tyrosinamide

La L-tyrosinamide (L-Tym) est un analogue de la L-tyrosine, un acide aminé nécessaire à la synthèse des hormones thyroïdiennes et de neurotransmetteurs tels que les catécholamines (dopamine, adrénaline et noradrénaline). Il entre également dans la composition de nombreuses protéines de l'organisme. Par exemple, les ADN topoisomérases sont des enzymes capables de couper transitoirement l'ADN, utilisant des résidus tyrosine pour cliver la liaison phosphodiester. C'est dans ce contexte qu'en 2001, Vianini *et al.* ont développé un protocole de sélection d'un aptamère dirigé contre la L-tyrosinamide.<sup>56</sup> Comme illustré dans la Figure 16, la différence entre ces deux molécules réside dans la modification du groupement carboxyle en groupement carboxamide. Ce choix a été effectué afin de reproduire une situation similaire à celle d'une chaîne polypeptidique.



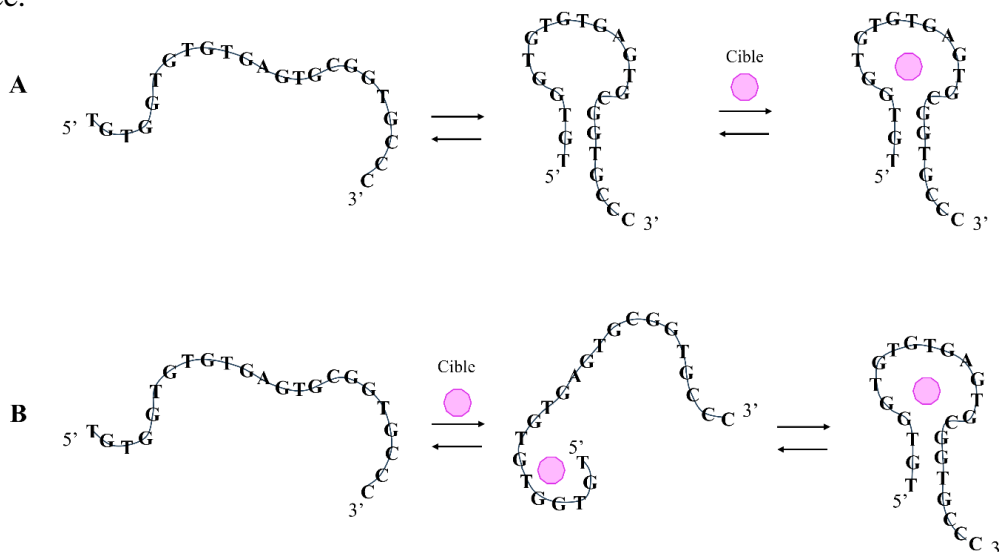
**Figure 16.** Structures de la L-tyrosine (A) et de la L-tyrosinamide (B).

L'aptamère anti-L-tyrosinamide sélectionné est une séquence d'ADN constituée de 49 bases, et présentant un  $K_d$  apparent de 45  $\mu\text{M}$  envers sa cible. Son isolement a nécessité 15 cycles de SELEX conventionnelle, où le ligand a été immobilisé à la surface d'une colonne de chromatographie d'affinité. La sélection a été réalisée à température ambiante, dans une solution tampon composée de 20 mM de Tris, 300 mM de NaCl et 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , à un pH de 7,6. La D-tyrosinamide n'est pas reconnue par l'aptamère, mettant en évidence son énantiosélectivité pour la reconnaissance de sa cible.

Par la suite, plusieurs expériences ont été menées par Challier *et al.* visant à comprendre le mécanisme de liaison entre l'aptamère et son ligand.<sup>167</sup> Dans un premier temps, ces dernières ont permis d'identifier la séquence minimale nécessaire à la reconnaissance de la L-tyrosinamide (Tableau 7). Cette séquence tronquée comporte 23 bases et a été utilisée dans les

travaux de cette thèse. Elle présente un  $K_d$  apparent de  $\sim 12 \mu\text{M}$  en l'absence de  $\text{MgCl}_2$  et de  $\sim 0,8 \mu\text{M}$  en présence de  $10 \text{ mM}$  de  $\text{MgCl}_2$ , soulignant l'importance du magnésium dans la stabilisation du complexe aptamère-cible. D'autres expériences ont également montré la contribution du magnésium dans l'induction du changement conformationnel de l'aptamère pour la reconnaissance de la cible. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux antérieurs.<sup>121</sup>

Il semble que la liaison entre l'aptamère et la cible se produise par le biais d'un mécanisme d'ajustement induit, où le ligand serait reconnu au niveau de l'extrémité 5', entraînant le repliement de l'aptamère autour de celui-ci jusqu'à l'extrémité 3'. Ce mécanisme s'oppose à celui de sélection conformationnelle, dans lequel la cible se lie préférentiellement à un aptamère pré-structuré (Figure 17).<sup>121,167</sup> Des expériences de spectroscopie RMN ont également montré que l'aptamère anti-L-tyrosinamide ne possède pas de structure secondaire à l'état libre.<sup>168</sup> Les travaux récents menés par l'équipe de Heemstra ont révélé l'existence d'un mécanisme de sélection conformationnelle en présence d'un brin complémentaire à l'aptamère, où la dissociation du duplex est nécessaire pour permettre la liaison avec la cible.<sup>169</sup> Par conséquent, la survenue de l'un ou l'autre de ces mécanismes semblerait être déterminée par l'état de l'aptamère en l'absence de la cible, hybridé à un brin complémentaire ou sous forme totalement libre. Ces travaux ont également mis en évidence la stabilité du complexe aptamère-L-tyrosinamide, caractérisée par une cinétique de dissociation lente une fois la reconnaissance effectuée.<sup>169</sup>



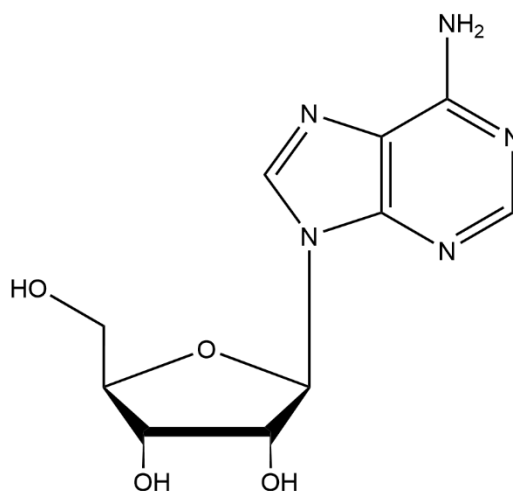
**Figure 17.** Mécanismes de sélection conformationnelle (A) et d'ajustement induit (B) appliqués à l'aptamère anti-L-tyrosinamide (23mer). La structure secondaire de l'aptamère à l'état lié est non déterminée.

La reconnaissance de la L-tyrosinamide par l'aptamère s'effectuerait grâce à des interactions  $\pi$ - $\pi$  entre les cycles aromatiques, ainsi que par le biais d'interactions électrostatiques entre le groupement amino chargé positivement de la cible et la structure polyanionique de l'aptamère. Ces interactions électrostatiques ont été mises en évidence par une étude de l'impact de la force ionique réalisée par Lin *et al.*, qui a démontré une réduction de l'affinité en cas de forte concentration en  $\text{Na}^+$ .<sup>121</sup>

Bien que Vianini et al. aient initialement proposé une structure secondaire en G-quartet en raison de la présence de plusieurs guanines dans la séquence de l'aptamère,<sup>56</sup> la structure secondaire précise de l'aptamère anti-L-tyrosinamide à l'état libre et complexé n'a pas encore été déterminée. Néanmoins, il a été utilisé à plusieurs reprises comme modèle de faisabilité dans l'élaboration de biocapteurs.<sup>170-176</sup>

### 2.5.2. Aptamère anti-Adénosine

L'adénosine (Figure 18) est un nucléoside qui participe à la régulation de multiples fonctions dans l'organisme, notamment au niveau cardiaque, cérébral et inflammatoire. Ses dérivés, l'AMP et l'ATP, jouent également un rôle important dans de nombreux processus biologiques tels que la transduction de signaux intracellulaires, le transport membranaire ainsi que la division cellulaire.<sup>177</sup>

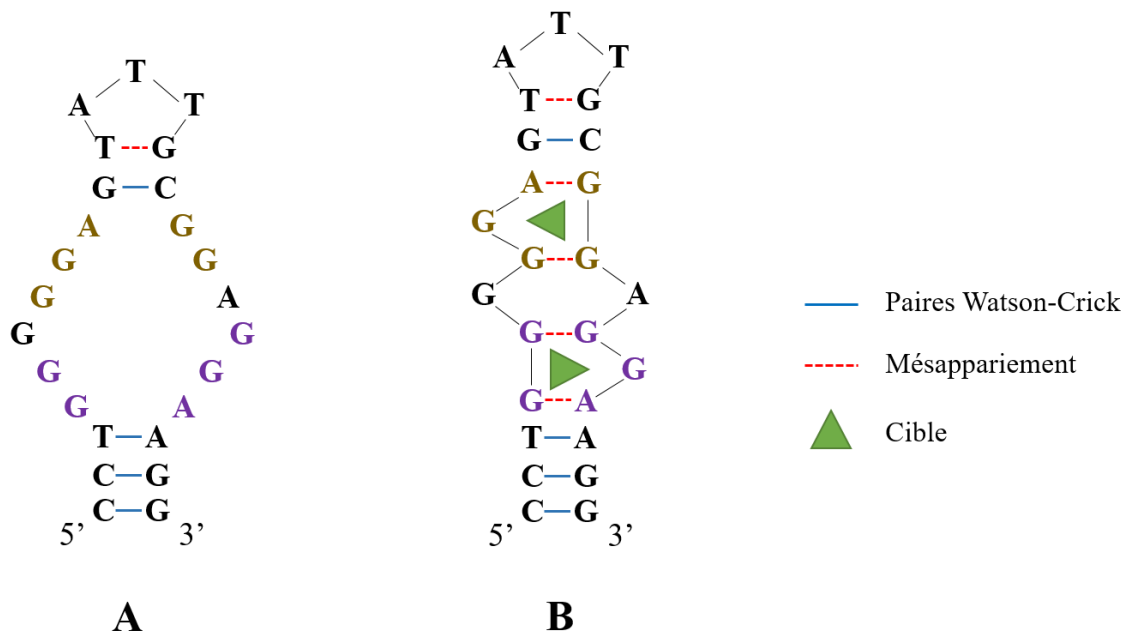


**Figure 18.** Structure de l'adénosine.



En 1995, Huizenga et Szostak ont sélectionné un aptamère en série ADN dirigé contre l'adénosine et ses dérivés phosphorylés (AMP, ADP, ATP), dont la séquence optimisée comporte 25 bases (Tableau 7). Un  $K_d$  apparent de 6  $\mu\text{M}$  a été déterminé pour l'adénosine, tandis qu'une affinité moindre a été observée pour ses analogues. La sélection a été effectuée dans des conditions identiques à celles décrites précédemment pour la L-tyrosinamide, et a nécessité 8 cycles de SELEX conventionnelle.<sup>52</sup>

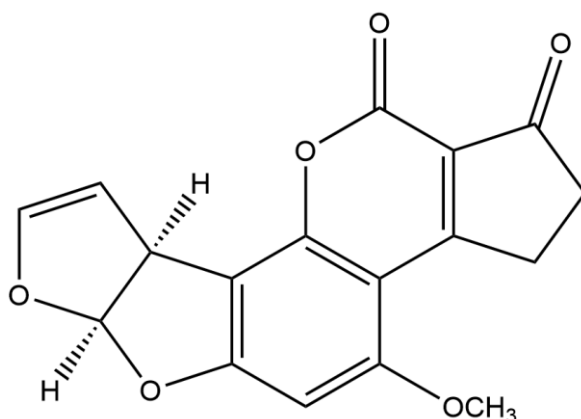
Deux ans plus tard, Lin et Patel ont utilisé la spectroscopie RMN pour étudier la structure secondaire de cet aptamère ainsi que les caractéristiques de liaison avec son ligand.<sup>178</sup> La Figure 19 présente une illustration de la structure identifiée, pouvant être décrite comme une « hairpin imparfaite », en raison de la présence d'une boucle interne. Cet aptamère est capable de former un complexe avec deux molécules d'adénosine, formant ainsi une structure stabilisée grâce à la formation de mésappariements G-A et G-G.<sup>177,179</sup> Des expériences complémentaires ont démontré l'importance du  $\text{Mg}^{2+}$  dans l'induction du changement conformationnel de l'aptamère pour la reconnaissance de sa cible.<sup>179</sup>



**Figure 19.** Structure secondaire de l'aptamère anti-Adénosine libre (A) et lié (B).

### 2.5.3. Aptamère anti-Aflatoxine B1

Les aflatoxines sont des métabolites secondaires produits par les champignons *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. Parmi elles, l'aflatoxine B1 (AFB1) est la plus fréquemment retrouvée (Figure 20), mais également la plus toxique, entraînant de graves conséquences sur la santé au niveau immunitaire, neurologique et hépatique. Étant considérée comme un agent carcinogène de groupe 1 par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), cette mycotoxine est régulièrement contrôlée dans de nombreux échantillons alimentaires ainsi que dans certaines boissons.<sup>180,181</sup>

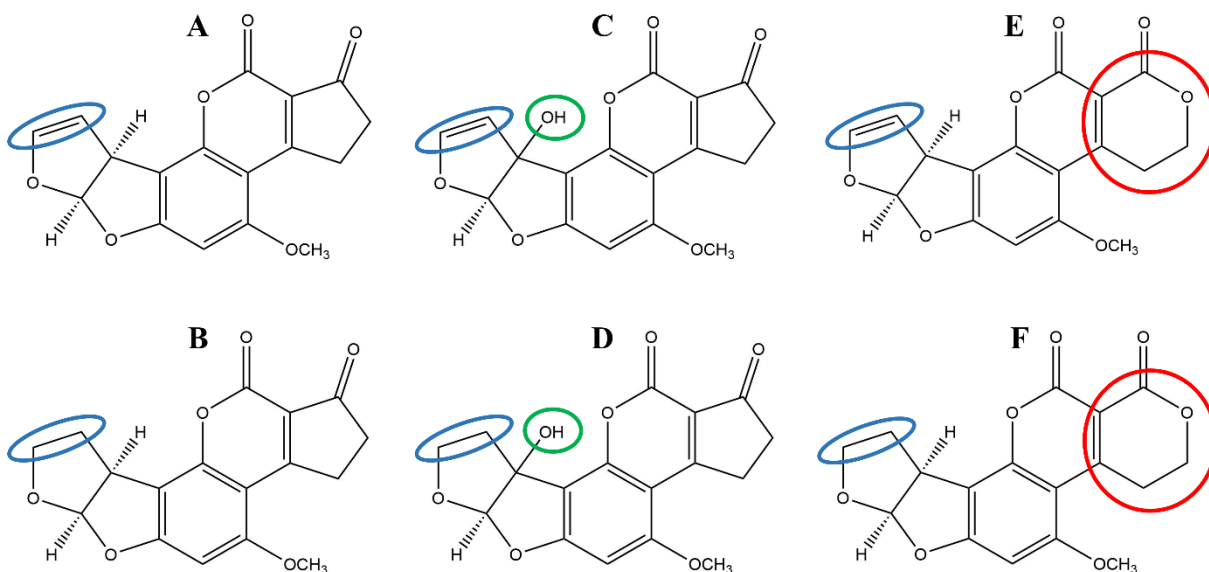


**Figure 20.** Structure de l'aflatoxine B1.

En 2012, un brevet est déposé par la société NeoVentures Biotechnology (Patent :PCT/CA2010/001292) pour la sélection d'un aptamère en série ADN ciblant l'AFB1. Cette dernière a été effectuée par SELEX conventionnelle, en utilisant une solution tampon contenant 10 mM d'HEPES, 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl et 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, avec un pH de 7,0. Au bout de 17 cycles, la séquence présentant la meilleure affinité pour le ligand est constituée de 50 bases, avec un K<sub>d</sub> de 12 nM. La structure secondaire identifiée est une configuration en simple tige-boucle.<sup>182</sup>

Quelques années plus tard, Sun et Zhao ont utilisé cet aptamère pour étudier son affinité de liaison avec l'AFB1. Les différentes expériences conduites ont permis d'identifier une séquence minimale de 26 bases (Tableau 7), présentant une configuration en tige-boucle, et conservant une bonne affinité de liaison avec un K<sub>d</sub> apparent de 49 nM.<sup>183</sup> Cette séquence résulte d'un raccourcissement au niveau de la tige, tandis que les nucléotides constituant la boucle ont été conservés (Figure 21). L'équipe a souligné l'importance de cette



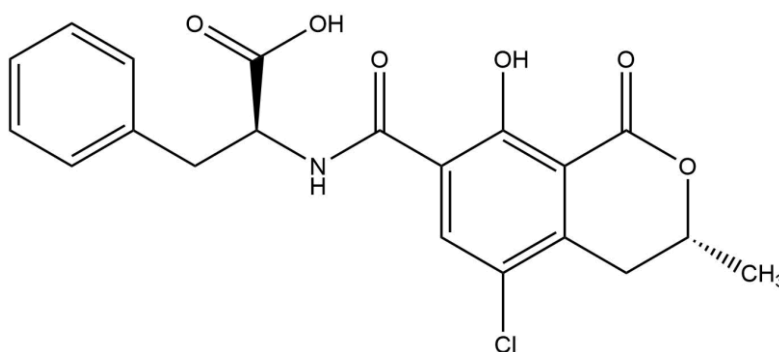


**Figure 22.** Analogues structuraux de l'AFB1. Les affinités mesurées sont classées par ordre décroissant : AFB1 (A)  $\approx$  AFB2 (B) > AFM1 (C)  $\approx$  AFM2 (D) > AFG1 (E)  $\approx$  AFG2 (F).

Figure adaptée de Sun et Zhao.<sup>183</sup>

#### 2.5.4. Aptamère anti-Ochratoxine A

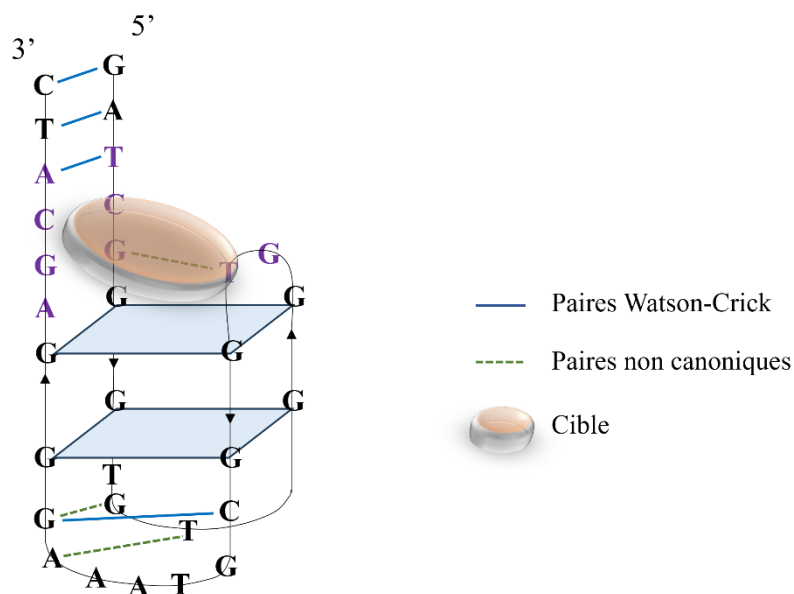
L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine produite par certaines souches fongiques des genres *Penicillium* et *Aspergillus* (Figure 23), retrouvée comme contaminant dans certains produits agroalimentaires. Elle possède des propriétés néphrotoxiques, immunotoxiques et tératogènes, et a été classée par le CIRC en tant qu'agent potentiellement carcinogène (groupe 2B).<sup>187,188</sup>



**Figure 23.** Structure de l'ochratoxine A.

Une séquence ADN de 61 bases reconnaissant spécifiquement l'OTA avec un  $K_d$  apparent de  $0,36 \mu\text{M}$  a été identifiée par Cruz-Aguado et Penner en 2008. La sélection a été réalisée en utilisant des conditions similaires à celles décrites précédemment pour l'AFB1, impliquant 13 cycles de SELEX conventionnelle. Les affinités de liaison ont également été étudiées sur des séquences tronquées générées par raccourcissement de l'extrémité 3'. Un  $K_d$  apparent de  $0,2 \mu\text{M}$  pour le 36mer et un  $K_d$  apparent de  $0,5 \mu\text{M}$  pour le 31mer ont été rapportées (Tableau 7).<sup>54</sup>

Plusieurs équipes ont utilisé cet aptamère dans l'objectif d'étudier ses caractéristiques structurales. Les résultats ont révélé une configuration en G-quadruplex antiparallèle comprenant deux G-quartets reliés par trois boucles.<sup>188,189</sup> Les extrémités 5' et 3' s'associent par appariement Watson-Crick, formant un duplex. Comme illustré dans la Figure 24, l'OTA interagit avec une poche située entre le duplex et le premier G-quartet en établissant des interactions  $\pi$ - $\pi$  avec son groupement isocoumarinique. De plus, une liaison halogène s'effectuant entre l'atome de chlore de l'OTA et le cycle aromatique de la cytosine en position 4 a été identifiée comme étant essentielle. Cette liaison permet de distinguer l'OTA de l'ochratoxine B (OTB) avec une différence d'affinité d'un facteur 100.<sup>188</sup>

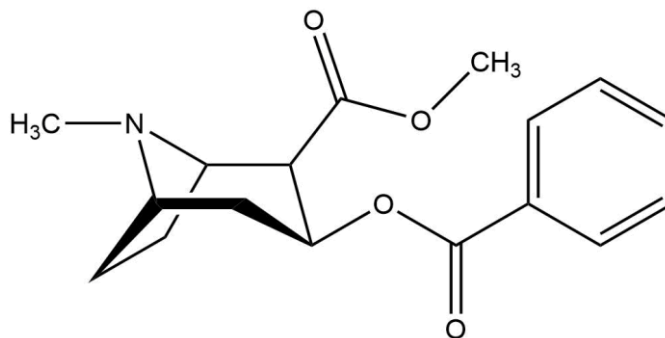


**Figure 24.** Structure secondaire de l'aptamère anti-OTA (36mer). Les bases impliquées dans la liaison avec l'OTA sont représentées en violet. Figure adaptée de Xu *et al.*<sup>188</sup>

Comme pour l'AFB1, la liaison entre l'OTA et son aptamère requiert la présence de cations divalents alcalino-terreux tels que les ions  $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$ . L'OTA étant chargée négativement à pH physiologique, sa reconnaissance devient difficile, voire impossible, en l'absence de ces cations.<sup>54,188</sup> La présence d'ions alcalins comme  $Na^+$  ou  $K^+$  s'est également avérée importante. En effet, ces espèces permettent de stabiliser la structure en G-quadruplex, et leur absence se traduit par une diminution significative de l'affinité de liaison.<sup>188</sup>

### 2.5.5. Aptamère anti-Cocaïne

La cocaïne (Figure 25) est un alcaloïde tropanique extrait de la feuille de coca. Elle est aujourd'hui considérée comme une substance stupéfiante en raison de ses propriétés psychostimulantes et de son caractère fortement addictogène.<sup>190</sup>



**Figure 25.** Structure de la cocaïne.

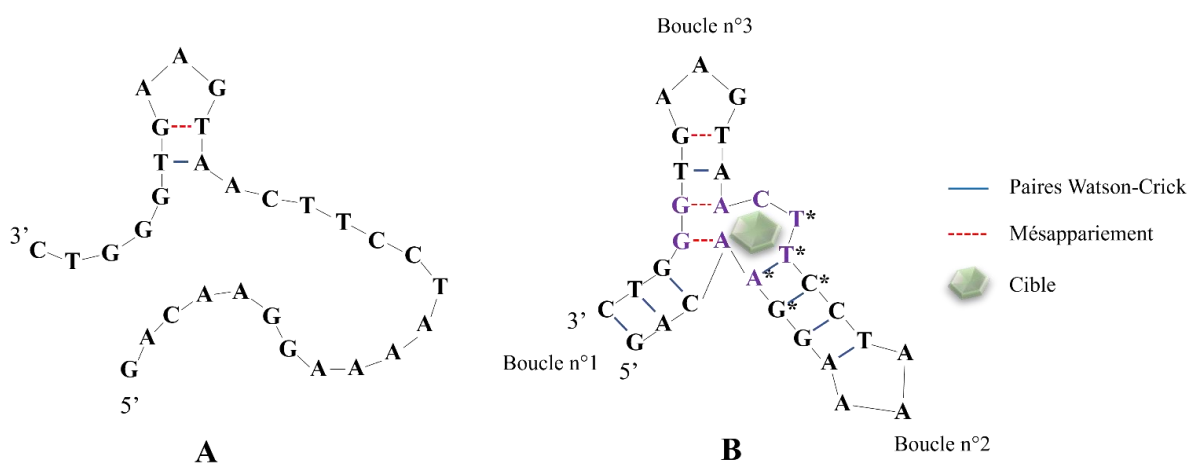
En 2001, l'équipe de Stojanovic est parvenue à isoler un aptamère en série ADN dirigé contre la cocaïne par SELEX conventionnelle. Ce dernier est constitué de 38 bases et présente un  $K_d$  compris entre 0,4 et 10  $\mu M$ . Un tampon à un pH de 7,4 composé de 20 mM de Tris, 140 mM de NaCl et 5 mM de KCl a été utilisé pour effectuer la sélection.<sup>60</sup>

Cet aptamère présente une structure secondaire particulière appelée « three-way junction », qui est formée de trois boucles distinctes se rejoignant au niveau d'une jonction formant une poche.<sup>191</sup> Plusieurs travaux de Neves *et al.* ont étudié l'impact de la longueur de ces boucles sur la stabilisation de cette structure ainsi que sur la complexation aptamère-cible. Les résultats obtenus ont montré une différence de conformation en fonction du nombre de bases constituant la boucle n°1. En présence d'au moins six paires de bases au niveau des extrémités 3' et 5', l'aptamère est préalablement structuré en l'absence de ligand. En

raccourcissant la boucle à trois paires de bases, l'aptamère se trouve dans un état non structuré à l'état libre, et l'ajout de cocaïne induit le changement conformationnel en « three-way junction » (Figure 26).<sup>191,192</sup> Cet aptamère, dont la séquence contient 30 bases, a été utilisé pour les travaux de cette thèse, et présente un  $K_d$  apparent compris entre 20 et 45  $\mu\text{M}$  (Tableau 7).<sup>60,191</sup>

Les deux paires A-G localisées au niveau de la poche de liaison ainsi que la thymine en position 16 s'avèrent être d'une grande importance pour assurer une structuration adéquate de l'aptamère, et par conséquent la reconnaissance de la cible de manière affine.<sup>191</sup>

Concernant la place des cations divalents, l'utilisation d'ions  $\text{Mg}^{2+}$  ne semble pas être un prérequis pour assurer une reconnaissance efficace du ligand par l'aptamère en question.<sup>60</sup> Toutefois, la force ionique joue un rôle crucial dans la stœchiométrie de liaison aptamère-cible. À faible concentration de NaCl, l'aptamère est capable de lier deux molécules de cocaïne au sein de deux sites indépendants. Ce phénomène est réversible en augmentant la concentration en NaCl, ce qui conduit à la préservation d'un seul site de liaison présentant une affinité plus élevée. Des expériences par RMN suggèrent que ce deuxième site de liaison, de moindre affinité par rapport au premier, se situe au niveau de la boucle n°2, et impliquerait de nouveau la thymine en position 16 (Figure 26). De manière similaire à la L-tyrosinamide, l'affinité plus élevée en l'absence de NaCl peut s'expliquer par la présence d'interactions électrostatiques entre la cible chargée positivement à pH physiologique et l'aptamère chargé négativement, qui se retrouvent perturbées dans des conditions de force ionique élevée.<sup>193</sup>



**Figure 26.** Structure secondaire de l'aptamère anti-cocaïne (30mer) libre (A) et lié (B). Les bases impliquées dans la liaison avec la cocaïne sont représentées en violet. Les bases impliquées dans le second site de liaison sont marquées par un astérisque.<sup>191,192</sup>

Cet aptamère présente une sélectivité envers la cocaïne par rapport à ses métabolites principaux, la benzoylecgonine et l'ecgonine méthylester.<sup>60</sup> Cependant, plusieurs travaux ont révélé sa capacité à reconnaître d'autres alcaloïdes, notamment la quinine et ses analogues, avec une affinité pouvant être jusqu'à 50 fois supérieure à celle de la cocaïne.<sup>193,194</sup> Ces observations suggèrent que le groupe méthoxy présent sur ces deux molécules joue un rôle important dans la reconnaissance par l'aptamère,<sup>194</sup> de même que les cycles aromatiques qui établissent des interactions  $\pi$ - $\pi$ .<sup>195</sup>

**Tableau 7.** Caractéristiques des aptamères utilisés dans les travaux de cette thèse.

Cible	Aptamère	Séquence (5' → 3')	K <sub>d</sub> apparent	Structure
L-tyrosinamide	ADN, 23mer	TGTGGTGTGTGAGTGCGGT GCCC	12 $\mu$ M (sans Mg <sup>2+</sup> ) 0,8 $\mu$ M (10 mM Mg <sup>2+</sup> )	Inconnue
Adénosine	ADN, 25mer	CCTGGGGGAGTATTGCGGA GGAAGG	6 $\mu$ M	Hairpin imparfaite
AFB1	ADN, 26mer	CACGTGTTGTCTCTCTGTGT CTCGTG	49 nM	Hairpin
OTA	ADN, 31mer	GATCGGGTGTGGGTGGCGT AAAGGGAGCATC	0,5 $\mu$ M (5 mM Mg <sup>2+</sup> ) 0,14 $\mu$ M (10 mM Mg <sup>2+</sup> )	G-Quadruplex antiparallèle
Cocaïne	ADN, 30mer	GACAAGGAAAATCCTTCAA TGAAGTGGGTC	20-45 $\mu$ M	Three-way junction



### 3. Les biocapteurs à base d'aptamères

#### 3.1. Définition d'un biocapteur

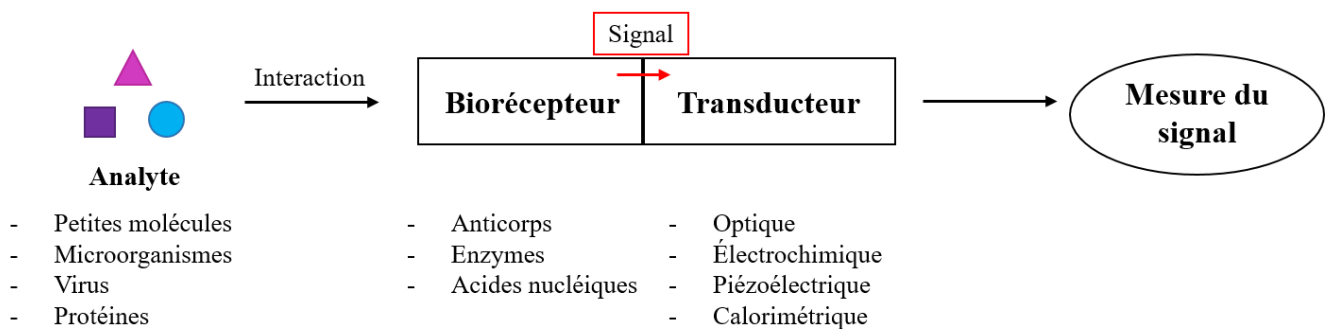
Selon l'IUPAC, un biocapteur est un dispositif analytique capable de détecter de manière quantitative ou semi-quantitative des substances présentes dans un échantillon biologique.<sup>148</sup> Il est constitué de plusieurs composants, représentés dans la Figure 27 ci-dessous;

- un biorécepteur, qui comprend un élément de reconnaissance biologique tel qu'un anticorps, une enzyme ou un acide nucléique. Ce dernier est immobilisé à la surface du dispositif et reconnaît une substance cible définie.

- un transducteur, qui convertit l'interaction entre l'analyte et le biorécepteur en un signal pouvant être de nature optique, électrochimique ou piézoélectrique,

- un élément électronique, qui traduit le signal analogique obtenu en un signal numérique, permettant ainsi de le corrélérer à la concentration de l'analyte cible dans le milieu.<sup>196-198</sup>

En 1962, Clark et Lyons ont mis au point le tout premier biocapteur, capable de mesurer la concentration de glucose en détectant la consommation de dioxygène lors de l'oxydation du substrat par la glucose oxydase.<sup>199</sup>



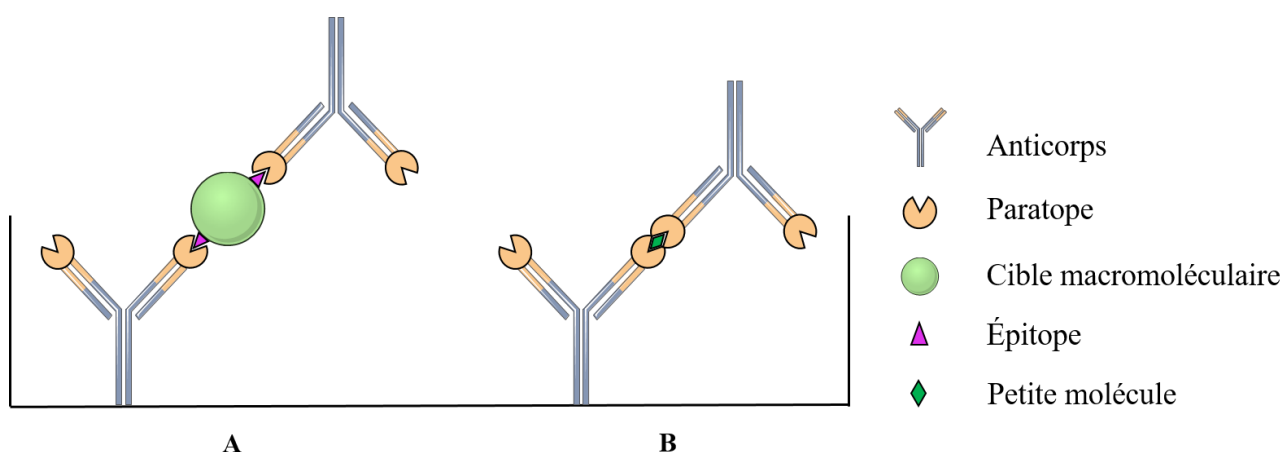
**Figure 27.** Représentation schématique d'un biocapteur conventionnel.

### 3.2. Détection de petites molécules

En laboratoire de biologie médicale, un grand nombre de techniques d'analyse repose sur les immunodosages, c'est-à-dire des méthodes basées sur la réaction entre un antigène et un ou plusieurs anticorps.<sup>200</sup>

Un défi majeur dans le domaine de la bioanalyse concerne actuellement la détection de « petites molécules », terme désignant des molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 1000 Da.<sup>51</sup> Cette catégorie englobe diverses substances telles que les médicaments, les toxines, les marqueurs biologiques, ou encore les ions métalliques. Ces espèces revêtent une grande importance dans les domaines de la médecine et de l'agroalimentaire, ce qui suscite une forte demande pour le développement de dispositifs d'analyse rapides et sensibles adaptés à ce type d'analyte.<sup>201</sup>

L'utilisation de systèmes dits « sandwich », impliquant la reconnaissance d'un analyte par deux anticorps, est largement répandue pour les macromolécules.<sup>202</sup> Cependant, cette approche est difficilement transposable à la détection de petites molécules en raison de la taille conséquente d'un anticorps, qui est d'environ 150 kDa, et de l'absence de deux sites de reconnaissance distincts à la surface de la molécule cible (Figure 28).<sup>202-204</sup> Pour des raisons de contraintes stériques, il est généralement nécessaire de n'employer qu'un seul anticorps, ce qui entraîne une perte de sensibilité et de spécificité, et expose à de nombreuses interférences.<sup>204</sup> Plusieurs équipes de recherche ont proposé des solutions alternatives, comme par exemple l'utilisation des régions du paratope<sup>204</sup> ou l'emploi de nanobodies,<sup>205</sup> mais ces techniques restent fastidieuses à concevoir et à manipuler.



**Figure 28.** Illustration d'une méthode « sandwich » dans le cadre du dosage d'une macromolécule (A) ou d'une petite molécule (B).

Dans ce contexte, l'utilisation des aptamères apparaît comme une alternative prometteuse pour la détection de ce type d'analyte. En effet, leur petite taille, d'environ 13 à 26 kDa, leur confère un avantage certain pour la reconnaissance de ligands de faible poids moléculaire.

### 3.3. Types d'aptacapteurs

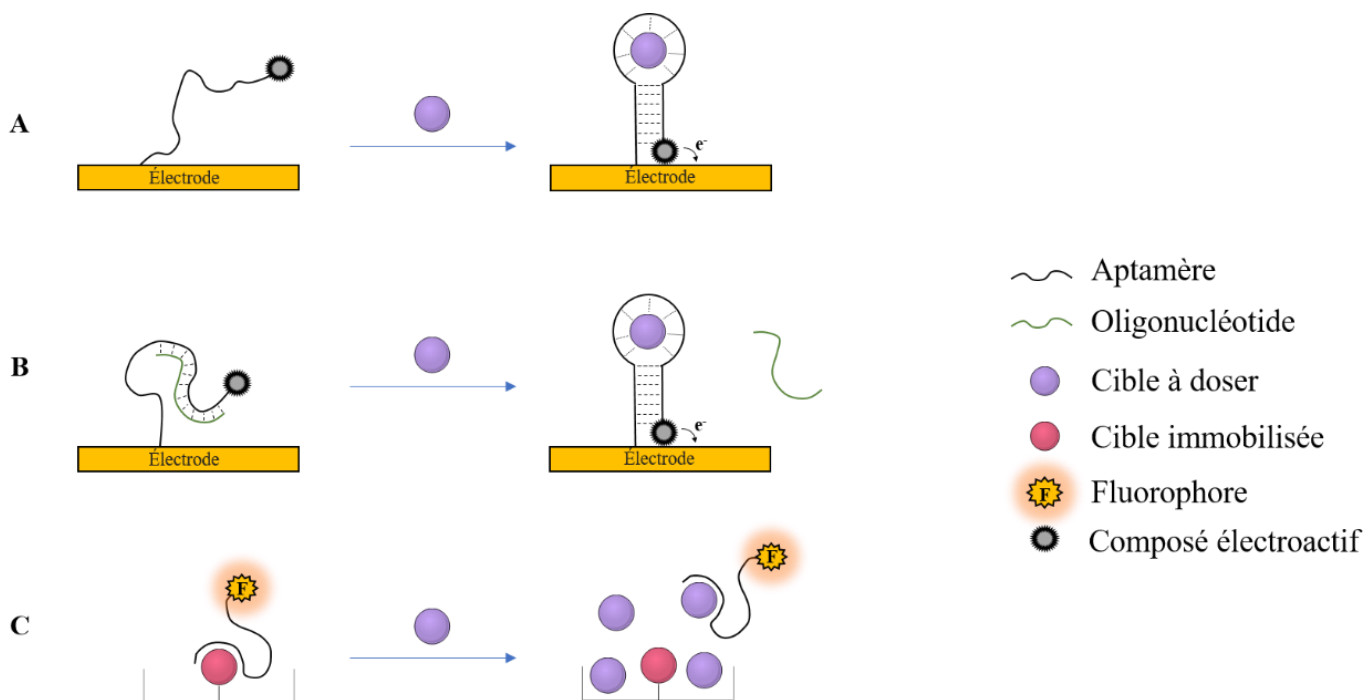
#### 3.3.1. Configurations

À partir de la fin des années 1990, les aptamères ont commencé à être employés comme biorécepteur pour le développement de biocapteurs, appelés « aptacapteurs ». Le premier aptacapteur rapporté dans la littérature a été mis au point en 1998 par Kleinjung *et al.*, pour la détection d'adénosine par compétition avec un analogue fluoromarcqué.<sup>206</sup> Pour les petites molécules, des études par RMN ont révélé qu'elles sont généralement incorporées à l'intérieur d'une cavité située au sein de l'aptamère structuré, limitant ainsi les possibilités de configurations d'analyse basées sur une double reconnaissance de type « sandwich ». <sup>43</sup>

En tenant compte de cette caractéristique, plusieurs modèles de conception d'aptacapteurs ont été décrits et sont illustrés dans la Figure 29. Le premier schéma, connu sous le nom de TISS (target-induced structure switching), repose sur la capacité intrinsèque de l'aptamère à changer de conformation lors de sa liaison avec la cible. Cette stratégie est la plus couramment utilisée pour l'analyse de petites molécules.<sup>201</sup> Cependant, il est important de souligner qu'un grand nombre d'aptamères ne sont pas capables d'être suffisamment déstructuré en l'absence de cible, propriété essentielle à une commutation structurale induite par la cible.<sup>207</sup> Les aptabeacons sont des exemples concrets de configuration TISS, où un fluorophore et un quencher sont utilisés.<sup>60</sup>

Le second modèle, appelé TID (target-induced dissociation) se base quant à lui sur le déplacement d'un oligonucléotide complémentaire à l'aptamère en présence de l'analyte dans le milieu.<sup>207</sup> Cette approche constitue une alternative intéressante au TISS lorsque l'aptamère n'adopte pas de changement structural significatif. Néanmoins, elle requiert une compréhension approfondie de l'emplacement du site de liaison à la cible ainsi que des régions présentant des modifications structurales importantes, afin d'assurer un déplacement efficace du brin complémentaire.<sup>201</sup>

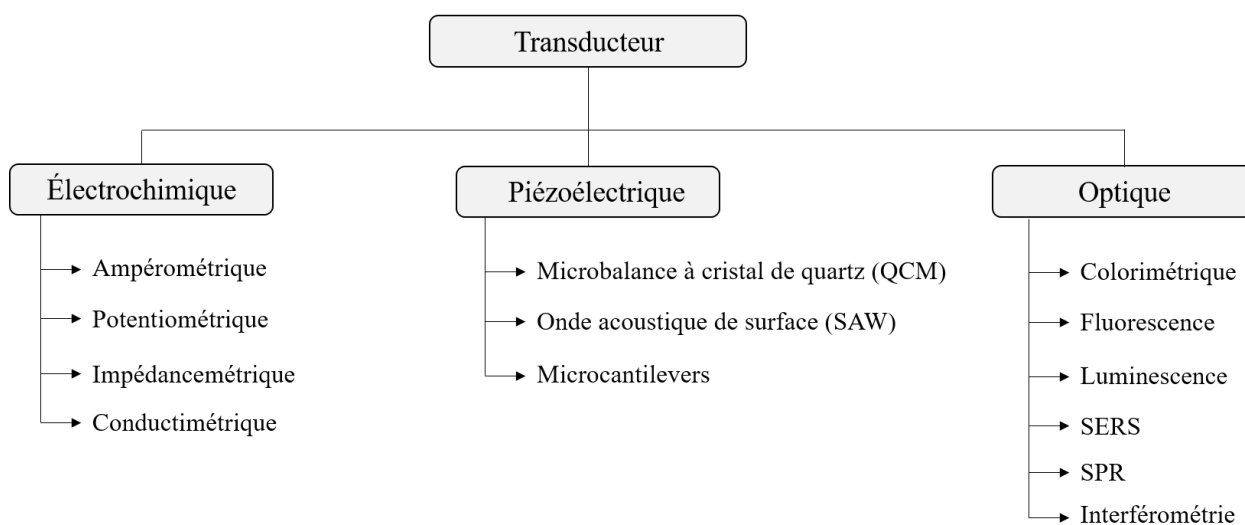
Le troisième schéma, dénommé « remplacement compétitif », implique une compétition entre la cible préalablement immobilisée et la cible présente dans l'échantillon à analyser.<sup>207</sup>



**Figure 29.** Configurations d'aptacapteurs pour petites molécules selon les modèles TISS (A), TID (B) et remplacement compétitif (C).

### 3.3.2. Classification des aptacapteurs

Les aptacapteurs peuvent être regroupés en trois catégories en fonction du mode de transduction employé : électrochimique, piézoélectrique et optique.<sup>196</sup> Chacune de ces catégories comprend une diversité de techniques, qui sont résumées dans la Figure 30.



**Figure 30.** Les différents modes de transduction d'un biocapteur.

### 3.3.2.1. Aptacapteurs électrochimiques

Les aptacapteurs électrochimiques font appel à un support conducteur, composé d'une couche revêtue d'un nanomatériau et d'une électrode, à la surface duquel l'aptamère est immobilisé.<sup>208</sup> Dans les techniques avec marquage, l'autre extrémité de l'aptamère est généralement fonctionnalisée avec un composé électrochimiquement actif, comme par exemple le ferrocène, le bleu de méthylène ou des nanoparticules métalliques.<sup>99</sup> L'interaction avec la cible est traduite en un signal électrique, de nature différente selon le type de système employé.

Les systèmes ampérométriques s'appuient sur une mesure du courant généré à potentiel constant.<sup>209</sup> Néanmoins, certaines techniques comme la voltampérométrie font intervenir une variation du potentiel, permettant d'obtenir des voltampérogrammes qui représentent l'intensité du courant en fonction du potentiel, et ainsi d'identifier les composés présents.

Les méthodes potentiométriques reposent sur la mesure d'une différence de potentiel entre une électrode de travail et une électrode de référence. Les transistors à effet de champ (FET) sont un exemple de méthode potentiométrique, où la complexation aptamère-cible provoque un transfert de charge dans un matériau semi-conducteur, entraînant ainsi une modification du potentiel de surface.<sup>150,210</sup>

Les techniques impédancemétriques comme la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) sont basées sur une mesure de l'impédance, qui correspond à la résistance au passage du courant électrique dans un circuit.<sup>208</sup>

Les dispositifs conductimétriques consistent à détecter les variations de conductivité du milieu lors de la reconnaissance de la cible. Néanmoins, très peu de publications mentionnent l'utilisation de ce type de stratégie dans le développement d'aptacapteurs.<sup>211,212</sup>

La transduction électrochimique dans son ensemble offre les avantages d'une simplicité d'utilisation, d'une rapidité d'analyse, d'une sensibilité et sélectivité importante, et de la capacité de miniaturisation. De plus, elle présente une rentabilité satisfaisante grâce à l'utilisation d'équipements de petite taille et peu coûteux, ainsi qu'à la consommation de faibles volumes de réactifs.<sup>210,213</sup> Ces bénéfices justifient son usage répandu dans le développement de biocapteurs.

Diverses revues de la littérature ont répertorié plusieurs aptacapteurs électrochimiques conçus spécifiquement pour l'analyse de petites molécules.<sup>2,97,208,214-216</sup> Un grand nombre d'entre eux se basent sur des techniques de voltampérométrie, tandis que les approches sans marquage dites « label-free », telles que le FET<sup>217-220</sup> ou l'EIS,<sup>208,216</sup> sont également de plus en plus populaires.

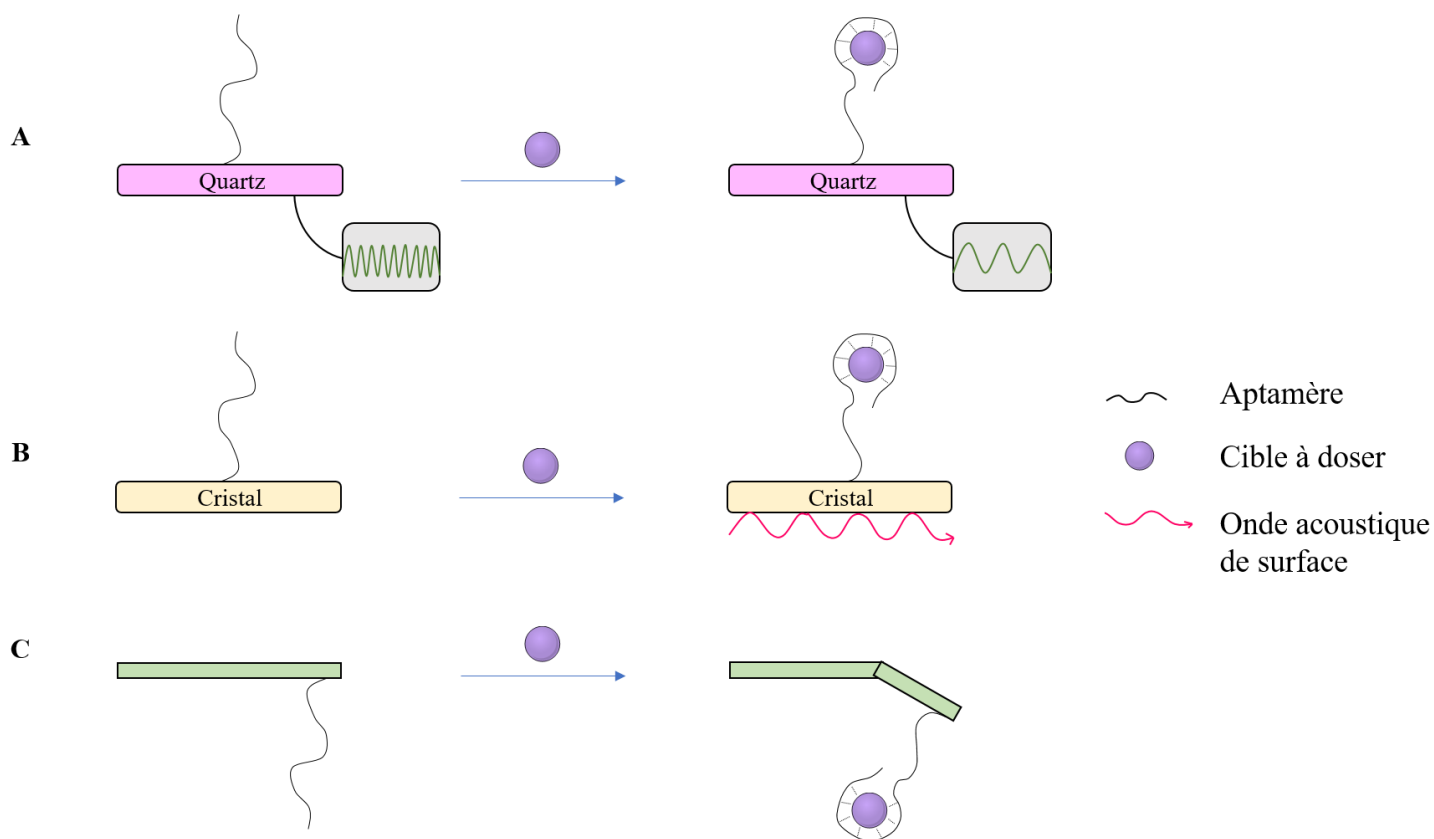
### 3.3.2.2. Aptacapteurs piézoélectriques

Les aptacapteurs piézoélectriques détectent des variations mécaniques se produisant lors de la reconnaissance de l'analyte.<sup>196</sup> Ces derniers sont subdivisés en plusieurs catégories, dont les principes sont schématisés dans la Figure 31.

Les microbalances à cristal de quartz (QCM) s'appuient sur les propriétés vibrationnelles d'un cristal sur lequel sont immobilisés les aptamères. L'association avec une cible se traduit par une augmentation de la masse du transducteur et par une diminution de la fréquence de résonance du cristal.<sup>221</sup> Le signal étant directement proportionnel à la masse du ligand, la détection de molécules de faible poids moléculaire par cette technique représente un défi.<sup>51,216</sup> Toutefois, quelques aptacapteurs utilisant la QCM ont été mis au point pour l'analyse de substances telles que l'ATP,<sup>222</sup> l'adénosine,<sup>223</sup> la théophylline,<sup>224</sup> les ions métalliques,<sup>225,226</sup> la tétracycline,<sup>227</sup> et la L-tyrosinamide.<sup>174</sup>

Les capteurs à onde acoustique de surface (SAW) reposent sur la propagation d'une onde acoustique à travers un matériau cristallin piézoélectrique. De manière semblable aux QCM, l'interaction aptamère-cible conduit à une réduction de la fréquence de vibration du cristal.<sup>99,150</sup>

Les microleviers, ou « microcantilevers », se composent d'une surface mobile sur laquelle les aptamères sont fixés de façon covalente, qui subit une courbure lors de la présence de cible. Le degré de flexion peut ensuite être détecté soit optiquement à l'aide d'un faisceau laser, soit électroniquement.<sup>43,210</sup> Plusieurs travaux ont utilisé cette technique pour la détection de petites molécules, notamment des antibiotiques,<sup>228,229</sup> des toxines,<sup>230,231</sup> et des pesticides.<sup>232,233</sup>



**Figure 31.** Représentation schématique d’aptacapteurs piézoélectriques. **A.** Microbalance à cristal de quartz (QCM). **B.** Capteur à onde acoustique de surface (SAW). **C.** Microcantilever.

L’ensemble des techniques décrites ci-dessus ont la particularité d’être « label-free », facilement miniaturisables, et de permettre un suivi en temps réel.<sup>43</sup>

### 3.3.2.3. Aptacapteurs optiques

La transduction optique est le mode de transduction prédominant dans le cadre de la conception d’aptacapteurs en raison de sa simplicité de mise en œuvre à moindre coût, de ses performances élevées en matière de sensibilité et de spécificité, de sa capacité à effectuer un suivi en temps réel, et de sa potentialité de miniaturisation.<sup>43,148,234</sup> Divers marqueurs de nature lumineuse, tels que des fluorophores, des luminophores ou des nanomatériaux, peuvent être employés dans une variété de formats, en étant soit attachés à l’extrémité de l’aptamère, soit utilisés comme intercalants dans des techniques « label-free ».<sup>235</sup>

Les méthodes colorimétriques convertissent l'interaction entre l'aptamère et la cible en un signal visuel observable à l'œil nu ou mesurable par spectroscopie UV, reflétant l'apparition, la modification, ou l'inhibition de couleur. Grâce à leur simplicité de détection, ces méthodes sont hautement attractives et couramment utilisées.<sup>234,235</sup>

Les dispositifs basés sur la fluorescence se distinguent par l'absorption d'énergie lumineuse par un fluorophore à une longueur d'onde d'excitation, qui est ensuite restituée sous forme de lumière fluorescente à une longueur d'onde d'émission spécifique.<sup>236</sup> Comme les méthodes colorimétriques, les techniques fluorimétriques sont largement répandues.<sup>150,235</sup> Une section ultérieure de ce manuscrit sera consacrée aux aptacapteurs basés sur la fluorescence.

Les techniques de chimiluminescence reposent sur un processus dans lequel le signal lumineux est produit par une réaction chimique, résultant du retour à l'état fondamental d'une espèce excitée, sans nécessiter de source lumineuse externe. Cette approche a récemment gagné en popularité en raison de leur rapidité d'action, de leur faible niveau de bruit de fond ainsi que de leur sensibilité accrue.<sup>235,237</sup>

La spectroscopie Raman exaltée en surface (SERS) analyse la lumière diffusée par un échantillon à partir d'une source de lumière monochromatique, suite à l'adsorption sur des surfaces nanométriques ayant pour effet d'exalter considérablement l'effet Raman.<sup>235,238</sup> Elle offre des avantages notables tels qu'une sensibilité très élevée ainsi que la possibilité de réaliser des analyses multiplexées.<sup>239</sup>

La SPR est une technique « label-free » basée sur des variations de l'indice de réfraction d'un laser lors de la liaison d'une cible à un aptamère immobilisé sur une surface métallique. Cette interaction entraîne une modification des propriétés de résonance d'ondes électromagnétiques appelées « plasmons de surface ».<sup>240</sup> Comme pour les capteurs piézoélectriques, la détection de petites molécules reste un défi en raison de l'influence de la masse du ligand sur l'intensité du signal obtenu.<sup>235</sup>

L'interférométrie exploite également les changements d'indice de réfraction se produisant lors de l'interaction aptamère-cible. Un faisceau lumineux est projeté sur la surface du biocapteur, où une partie est réfléchi tandis que l'autre se propage. L'intersection de ces deux rayons



lumineux conduit à la création de motifs d'interférences qui sont sensibles aux modifications de l'indice de réfraction. Ces motifs sont ensuite analysés et traduits en un signal mesurable.<sup>1,241</sup>

Plusieurs revues traitant des aptacapteurs optiques mis au point pour l'analyse d'une variété de petites molécules sont accessibles dans la littérature.<sup>1,97,216,234,235</sup>

### 3.4. Aptacapteurs optiques basés sur la fluorescence

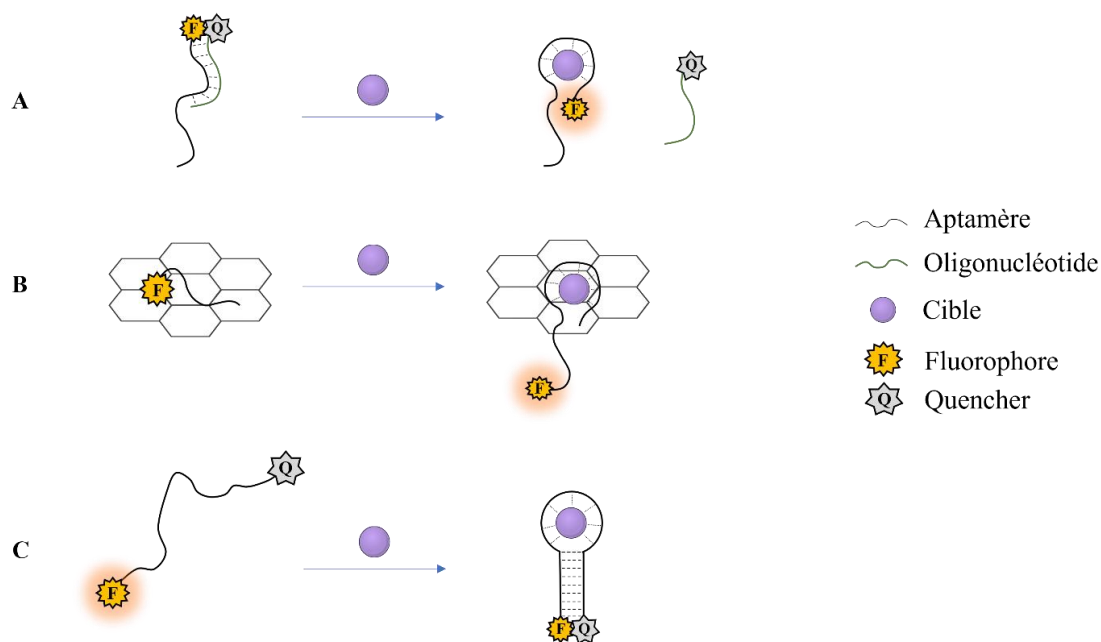
La fluorescence est le mode de transduction optique le plus populaire pour l'élaboration d'aptacapteurs.<sup>43,235</sup> Elle présente de nombreux avantages tels qu'une simplicité d'utilisation, des performances analytiques satisfaisantes en terme de sensibilité, de sélectivité et de limite de détection, une rapidité de réponse, la possibilité de suivi en temps réel, ainsi qu'un bon rapport coût-efficacité.<sup>150,242</sup> En complément de ces atouts, il est possible de concevoir et d'adapter de nombreuses stratégies de détection en fonction du type de cible à analyser, ce qui ajoute une flexibilité supplémentaire. Le changement de signal peut se traduire par une augmentation de la fluorescence, dans le cadre de schémas « signal-on », ou par une diminution de la fluorescence, correspondant à un schéma « signal-off ».<sup>243</sup> Ces schémas font intervenir au moins un fluorophore qui peut être soit lié de façon covalente à l'extrémité de l'aptamère, soit utilisé sous forme libre et agissant comme un agent intercalant. En effet, le processus de marquage covalent des aptamères avec un fluorophore peut potentiellement altérer l'affinité de liaison avec la cible.<sup>150,235,243</sup> C'est pourquoi des méthodes de détection « label-free » ont été développées afin de surmonter ces difficultés. Ce genre d'approche implique le recours à des espèces fluorescentes particulières comme par exemple le DAPI, le SYBR Green, ou encore l'acridine orange. Ces agents ont la capacité de s'intercaler au sein de l'ADN simple brin ou double brin, ou de se lier à des sites abasiques spécialement construits, et d'induire des changements de fluorescence qui dépendent de leurs propriétés ainsi que du type de modification conformationnelle de l'aptamère.<sup>235,243</sup> Par exemple, Chovelon *et al.* ont utilisé le SYBR Green, un fluorophore capable de s'incorporer dans l'ADN double brin, pour élaborer deux stratégies pour la détection d'ions  $Hg^{2+}$  et d'adénosine. Ces stratégies opèrent respectivement selon un schéma « signal-on » et « signal-off », en exploitant les différentes caractéristiques structurales des aptamères anti- $Hg^{2+}$  et anti-adénosine.<sup>244</sup> D'autres entités telles que les quantum dots (QDs) ou d'autres nanomatériaux fluorescents peuvent également être employées.<sup>235,242</sup>

Les approches les plus couramment utilisées pour le développement d'aptacapteurs sont celles qui se basent sur le mécanisme de transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) ainsi que celles basées sur l'anisotropie de fluorescence.<sup>242</sup>

### 3.4.1. FRET

Le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) est une technique reposant sur le transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes, l'une jouant le rôle de « donneur » d'énergie et l'autre celui d'« accepteur ». Lorsqu'elles se trouvent à proximité, l'énergie est transmise du donneur à l'état excité à l'accepteur qui est excitable par le biais d'une interaction dipôle-dipôle non radiative, c'est-à-dire sans émission de lumière.<sup>245</sup> Ce processus entraîne une diminution de la fluorescence du donneur et une augmentation concomitante de celle de l'accepteur. Par conséquent, cette méthode permet d'étudier l'interaction entre deux molécules en fonction de leur distance relative.<sup>246</sup>

Pour la conception d'aptacapteurs, l'utilisation d'un couple fluorophore-quencher est largement répandu.<sup>247</sup> Dans les formats « signal-on », il est usuel de mettre au point des méthodes basées sur une configuration TID, avec déplacement d'un oligonucléotide marqué par un quencher lorsque l'aptamère fluoromarké reconnaît son ligand.<sup>248-253</sup> Certains travaux exploitent les propriétés de quenching du graphène, permettant d'éviter la création de sondes complémentaires marquées.<sup>254-257</sup> Concernant les schémas « signal-off », les aptabeacons sont les plus fréquemment retrouvés. Leur design implique un double marquage de l'aptamère avec un fluorophore et un quencher situés respectivement à chaque extrémité. Lors de la reconnaissance de la cible, les deux marqueurs se rapprochent grâce à un mécanisme de TISS.<sup>60,258-260</sup> La Figure 32 ci-dessous illustre les mécanismes de ces différents formats.



**Figure 32.** Schémas de FRET selon un format « signal-on » (A, B) et « signal-off (C). **A.** Configuration TID. **B.** Quenching par le graphène. **C.** Aptabeacon.

Les méthodes basées sur le FRET ont l'avantage d'être simples, sensibles et plutôt versatiles, mais nécessitent de remplir certaines conditions, notamment le respect d'un chevauchement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur, ainsi que le respect d'une distance optimale d'environ 1 à 10 nm entre le donneur et l'accepteur.<sup>245,247</sup>

### 3.4.2. Anisotropie de fluorescence

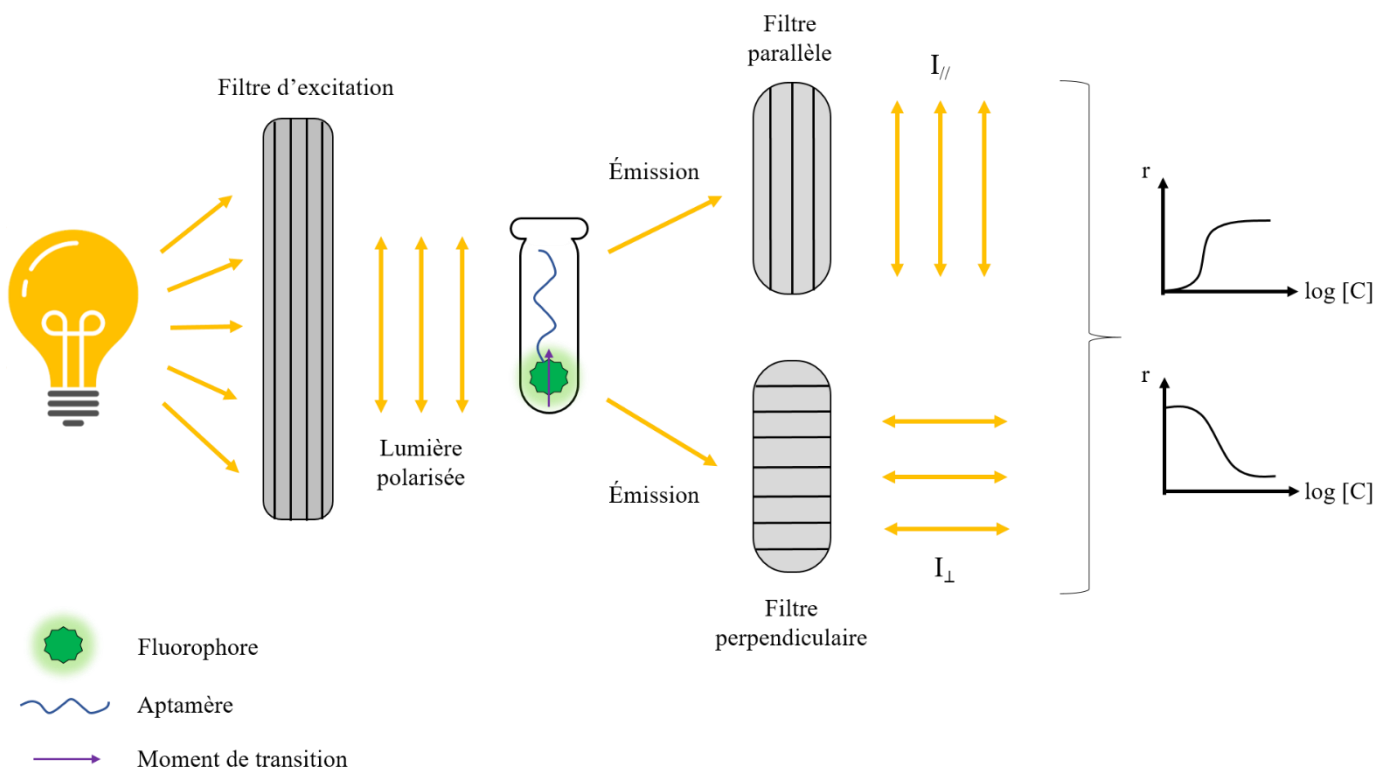
L'anisotropie de fluorescence est une technique d'excitation photosélective par de la lumière polarisée opérant en phase homogène. L'absorption de cette lumière par un fluorophore est caractérisée par le moment de transition, et se produit préférentiellement lorsque l'orientation du moment de transition est parallèle au vecteur champ électrique des photons. Lorsqu'un changement d'orientation survient, la lumière émise est dépolarisée.<sup>261</sup> Une illustration du principe de cette technique est proposée dans la Figure 33.

Cette dépolarisation est mesurée soit par l'anisotropie de fluorescence  $r$ , soit par le degré de polarisation  $p$ , d'après les équations suivantes :

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

Avec  $I_{//}$  l'intensité de fluorescence émise parallèlement au rayon incident,  $I_{\perp}$  l'intensité de fluorescence émise perpendiculairement au rayon incident, et  $G$  le facteur de correction déterminé à partir de solutions standards selon les instructions du fabricant.<sup>171,262</sup>

Le degré de polarisation  $p$  est mesuré par rapport à l'intensité de fluorescence dans la direction d'observation, tandis que l'anisotropie de fluorescence  $r$  est obtenue en normalisant par rapport à l'intensité totale d'émission de fluorescence. On privilégie l'utilisation de la formule d'anisotropie de fluorescence car elle est considérée comme étant plus représentative des phénomènes physiques sous-jacents.<sup>245,263</sup>



**Figure 33.** Principe de la technique d'anisotropie de fluorescence.

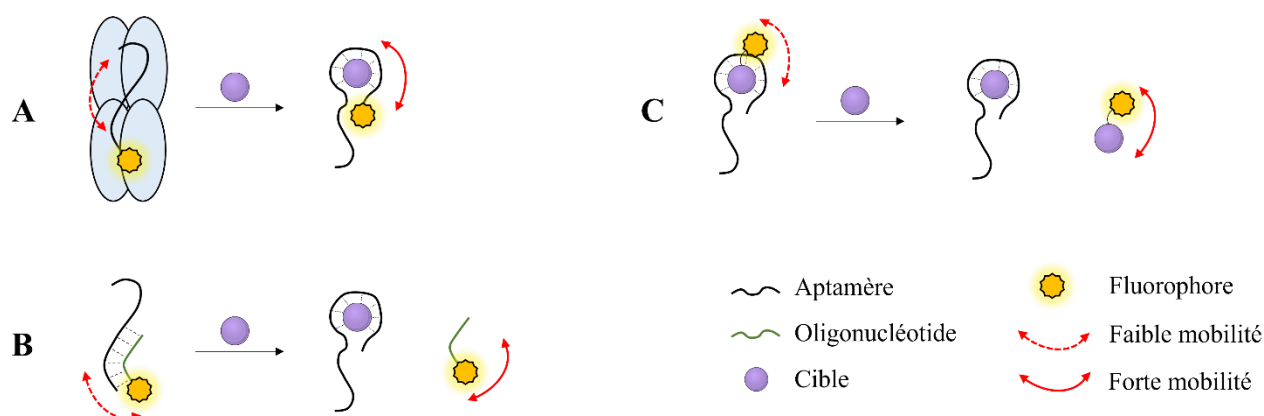
Afin de mieux comprendre les paramètres influençant l'anisotropie de fluorescence, un modèle dans lequel le fluorophore est assimilé à une sphère a été proposé par Perrin et est représenté par l'équation suivante :

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

Avec  $r_0$  l'anisotropie de fluorescence en l'absence de tout processus de dépolarisation,  $\tau$  la durée de vie de l'état excité, et  $\theta$  le temps de corrélation rotationnelle.<sup>245</sup> Il est important de noter que  $\theta$  dépend de la viscosité, de la température et du volume du fluorophore.<sup>264</sup>

À partir de cette équation, il est tout à fait envisageable de concevoir des méthodes d'analyse qui jouent sur ces deux paramètres. Une première stratégie vise à se focaliser sur la composante rotationnelle globale en augmentant le volume apparent du fluorophore. Un aptamère fluoromarké à l'état libre en solution présente une rotation rapide, ce qui entraîne une émission de lumière fortement dépolarisée, et donc une faible anisotropie. L'intervention d'une macromolécule comme une nanoparticule ou une protéine en tant qu'amplificateurs de masse ou de taille<sup>265,266</sup> provoque une augmentation de  $\theta$ , se traduisant par une émission de lumière faiblement dépolarisée, et par une augmentation de l'anisotropie.<sup>267</sup> Cette composante globale peut également être exploitée par l'hybridation entre l'aptamère et un oligonucléotide fluoromarké, induisant une certaine rigidité se traduisant par une anisotropie élevée.<sup>268</sup> Lors de la détection du ligand, le déplacement de cet oligonucléotide entraîne la diminution de l'anisotropie.<sup>170,269</sup> Enfin, des approches compétitives avec utilisation d'une cible fluoromarkée peuvent également être mises en œuvre,<sup>270</sup> mais de façon moins fréquente en raison de la perturbation de l'affinité de liaison lors du marquage d'une petite molécule et de la nécessité de synthétiser un analogue marqué. Ces différentes méthodes sont illustrées dans la Figure 34 ci-dessous.

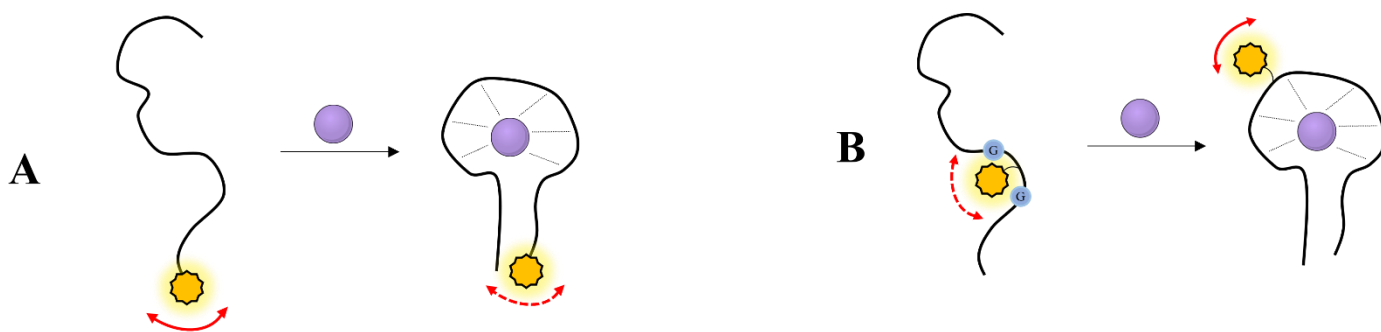
Le principal bénéfice de cette stratégie réside dans son indépendance vis-à-vis des caractéristiques structurales de l'aptamère. En revanche, l'affinité entre l'aptamère et la cible peut être réduite en fonction de la stabilité des duplex formés entre l'aptamère et l'oligonucléotide ou l'analogue fluoromarké, pouvant conduire à une perte de sensibilité (Tableau 8).<sup>271</sup>



**Figure 34.** Méthodes d’analyse en anisotropie de fluorescence consistant à augmenter le volume apparent du fluorophore. **A.** Par un amplificateur de masse (adapté de Zhu *et al.*<sup>265</sup>). **B.** Par un oligonucléotide complémentaire (adapté de Zhu *et al.*<sup>170</sup>). **C.** Par compétition avec une cible fluoromarkée (adapté de Li *et al.*<sup>270</sup>).

Une stratégie plus subtile consiste à agir sur la composante rotationnelle locale, c’est-à-dire l’environnement autour du fluorophore. Ainsi, un fluorophore disposant d’une certaine liberté de mouvement intrinsèque émet une lumière peu polarisée et présente une faible anisotropie, tandis qu’un fluorophore plus contraint émet une lumière fortement polarisée, donnant lieu à une anisotropie élevée.<sup>171</sup> Les travaux axés sur cette approche sont généralement basés sur un format de détection directe, qui repose sur le changement conformationnel de l’aptamère lors de la reconnaissance de la cible.<sup>171,179</sup> Cette composante est fortement conditionnée par la nature du fluorophore et de ses interactions avec les bases avoisinantes.<sup>264</sup> Par exemple, la fluorescéine et le Texas Red, qui sont respectivement dianionique et zwitterionique à pH neutre, présentent une mobilité intrinsèque différente lorsqu’ils sont greffés à l’extrémité d’un aptamère.<sup>272,273</sup> L’équipe de Zhao a également exploité l’interaction entre le tétraméthylrhodamine (TMR) et les guanines avoisinantes, qui est significativement modifiée lors du changement conformationnel de l’aptamère, pour la détection de plusieurs petites molécules.<sup>183,184,190,274,275</sup> La Figure 35 représente ces méthodes.

La simplicité de mise en œuvre constitue un avantage majeur de cette stratégie. Cependant, elle requiert un changement conformationnel suffisamment important de l’aptamère pour générer un signal significatif (Tableau 8).<sup>170</sup>



**Figure 35.** Méthodes d’analyse en anisotropie de fluorescence basées sur une détection directe. **A.** Selon un changement conformationnel significatif de l’aptamère (adapté de Ruta *et al.*<sup>171</sup>). **B.** Selon l’interaction entre le TMR et les guanines avoisinantes (adapté de Liu *et al.*<sup>274</sup>).

**Tableau 8.** Avantages et limites des stratégies basées sur une modification du temps de corrélation rotationnelle.

	<b>Format direct</b>	<b>Format indirect</b>
<b>Avantages</b>	- Simplicité.	- Applicabilité pour des aptamères n’opérant pas de changement conformationnel.
<b>Limites</b>	- Changement conformationnel significatif nécessaire. - Connaissance précise de la structure secondaire des aptamères et des régions reconnaissant spécifiquement la cible.	- Synthèse d’un analogue fluoromarcqué de la cible ou d’un oligonucléotide complémentaire : processus laborieux et coûteux. - Affinité aptamère-cible possiblement réduite. - Manque de sensibilité.

La plupart des travaux se focalisent sur les modifications de  $\Theta$ , avec généralement une combinaison des deux composantes décrites précédemment.<sup>171</sup> Une dernière stratégie beaucoup moins employée, quant à elle, est basée sur la modification de la durée de vie de l’état excité. L’utilisation du SYBR Green a permis d’observer un changement drastique de signal dû à la

modification de  $\tau$  entre sa forme libre en solution et sa forme liée à l'aptamère.<sup>244,276</sup> Bien que cette approche soit particulièrement innovante, elle nécessite cependant une bonne connaissance des caractéristiques structurales de l'aptamère afin d'établir un schéma de détection optimal.

L'anisotropie de fluorescence est une technique largement employée pour l'analyse de petites molécules par le biais d'aptacapteurs. Cette popularité s'explique par sa simplicité d'utilisation, sa robustesse, sa rapidité, sa reproductibilité ainsi que par sa capacité de screening à haut-débit.<sup>171,183,264,268</sup> Plusieurs synthèses bibliographiques fournissant un état des lieux de l'utilisation de l'anisotropie de fluorescence pour la détection de ce type de cible sont également disponibles dans la littérature.<sup>242,264,268</sup>





# Résultats et discussion

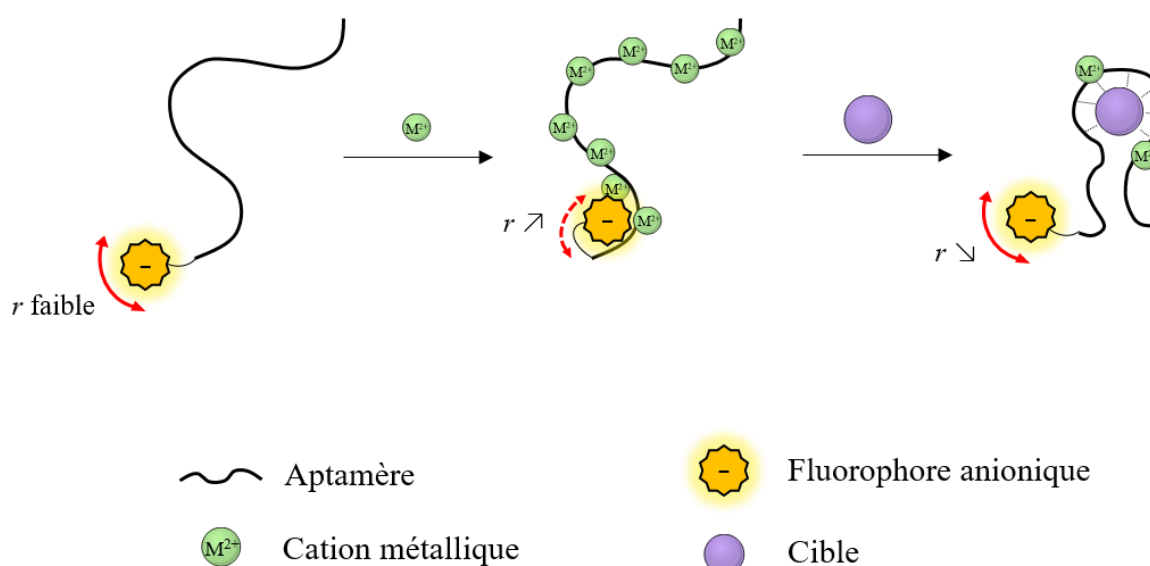
## 1. Utilisation de cations métalliques de transition et post-transition dans le développement d'un aptacapteur pour la détection de petites molécules par anisotropie de fluorescence.

### Contexte et stratégie :

Les méthodes actuelles pour la détection de petites molécules reposent généralement sur la capacité inhérente de l'aptamère à changer de conformation de façon significative lorsqu'il reconnaît l'analyte. Idéalement, l'utilisation d'aptamères possédant cette faculté naturelle est préférable, mais cela implique de passer par un processus de criblage parmi de nombreuses sondes, ou d'utiliser une méthode de sélection particulière telle que la capture-SELEX, pouvant être très long et coûteux. Lorsque ces options ne sont pas réalisables, une solution envisageable consiste à convertir une sonde aptamérique en un commutateur fonctionnel en introduisant des éléments visant à déstabiliser la structure de l'aptamère. Pour ce faire, on a souvent recours à un oligonucléotide complémentaire, des polymères ou des nanomatériaux pour élaborer des stratégies de déplacement par compétition avec la cible.<sup>265,277,278</sup> Cependant, la conception d'un capteur optimal requiert une connaissance précise des caractéristiques structurales de l'aptamère, en particulier la localisation du site de reconnaissance de la cible ainsi que des régions impliquées dans des modifications structurales significatives. Il faut également considérer les contraintes cinétiques liées à l'affinité importante entre l'aptamère et le compétiteur, définies par des constantes de dissociation cinétique  $k_{off}$  très faibles.

Afin de s'affranchir des difficultés évoquées ci-dessus, nous nous sommes intéressés à l'élaboration d'outils alternatifs n'exigeant pas de disposer de données détaillées concernant

leurs caractéristiques structurales. L'approche que nous avons mise en œuvre s'appuie sur l'utilisation d'ions métalliques de transition et de post-transition comme outils de commutation structurale, en tirant parti de leur capacité à perturber la structure des acides nucléiques. Comme décrit dans la section 1.2.3 de la partie bibliographique du présent manuscrit, ces derniers sont capables d'interagir avec les groupements phosphates et les bases nucléiques des aptamères à des niveaux qui dépendent de leur position dans la classification HSAB présentée dans la Figure 10. Nous avons ainsi développé un biocapteur opérant en phase homogène, qui repose sur des modifications des interactions électrostatiques entre les cations métalliques liés à l'aptamère et un fluorophore anionique greffé à son extrémité. Le principe général est basé sur l'activité de commutation de l'aptamère, qui passe d'un état déstructuré et inactif où de nombreux ions métalliques sont complexés, à un état structuré et actif lorsqu'il se lie à la molécule cible, associé à un déplacement des ions métalliques (Figure 36). Ce processus de commutation est suivi par la technique d'anisotropie de fluorescence, en mesurant le changement du signal résultant de la modification de la mobilité propre du fluorophore.

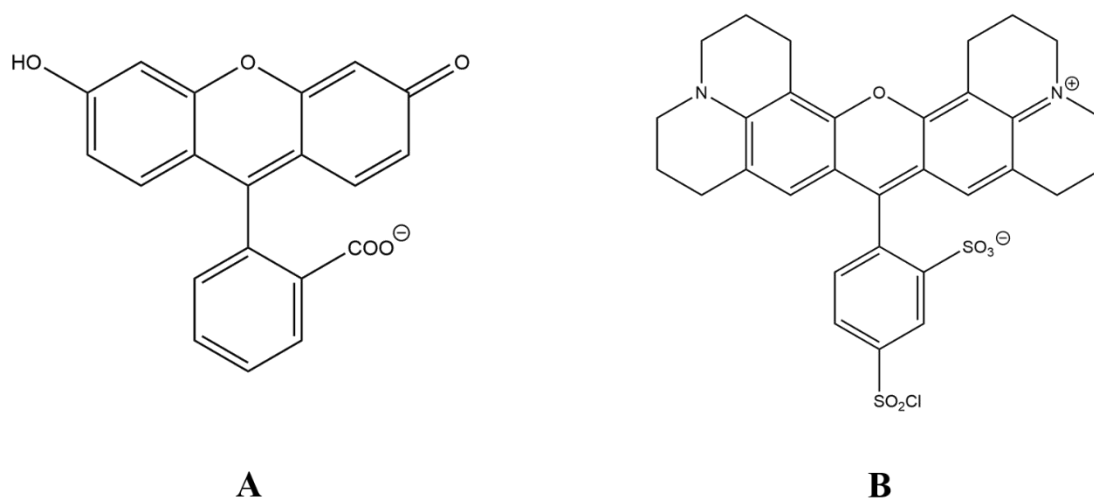


**Figure 36.** Principe général d'une stratégie de commutation structurale régulée par les ions métalliques pour le développement d'un aptacapteur optique.

Afin d'étudier la faisabilité de notre méthode, nous avons opté pour l'aptamère ciblant la L-tyrosinamide (180,2 g/mol) comme système modèle. Une première étape de screening a été réalisée en testant six ions métalliques de transition et post-transition. L'objectif était de choisir l'ion induisant la plus grande différence de signal entre l'absence et la présence de cible.

Notre sélection a globalement couvert la classification HSAB (Figure 10), en incluant des ions métalliques « soft » ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ) et « borderline » ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$ ).

Deux fluorophores de charge différente au pH considéré (6,3), la fluorescéine et le Texas Red, ont été employés afin d'étudier le niveau de contribution locale par effet électrostatique. (Figure 37). Le Texas Red, zwitterionique, établit des interactions avec l'ADN en l'absence de cations métalliques, ce qui le rend moins sensible aux changements de son environnement local. En revanche, la fluorescéine, anionique, présente une liberté de mouvement importante en raison de sa répulsion électrostatique envers l'ADN chargé négativement. Cela lui confère une grande sensibilité aux variations du potentiel électrostatique local lors de la fixation des cations métalliques. Cette caractéristique en fait un candidat privilégié pour la conception de notre biocapteur.



**Figure 37.** Structures de la fluorescéine (A) et du Texas Red (B).

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue *Angewandte Chemie* en Avril 2021.<sup>279</sup>



Aptamer Probes Hot Paper

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 12346–12350

Internationale Ausgabe: doi.org/10.1002/anie.202102254

Deutsche Ausgabe: doi.org/10.1002/ange.202102254

# Aptamer Switches Regulated by Post-Transition/Transition Metal Ions

Blandine Billet, Benoit Chovelon, Emmanuelle Fiore, Farid Oukacine, Mel-Alexandre Petrillo, Patrice Faure, Corinne Ravelet,\* and Eric Peyrin\*

**Abstract:** We introduced an aptamer switch design that relies on the ability of post-transition/transition metal ions to trigger, through their coordination to nucleobases, substantial DNA destabilization. In the absence of molecular target, the addition of one such metal ion to usual aptamer working solutions promotes the formation of an alternative, inert DNA state. Upon exposure to the cognate compound, the equilibrium is shifted towards the competent DNA form. The switching process was preferentially activated by metal ions of intermediate base over phosphate complexation preference (i.e.  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ) and operated with diversely structured DNA molecules. This very simple aptamer switch scheme was applied to the detection of small organics using the fluorescence anisotropy readout mode. We envision that the approach could be adapted to a variety of signalling methods that report on changes in the surface charge density of DNA receptors.

**D**uring the last two decades, nucleic acid aptamers used as synthetic affinity reagents have found very impressive applications in a variety of scientific areas including therapeutics, nanotechnology and diagnostics.<sup>[1]</sup> In the growing sensing field, these functional oligonucleotides are converted into sensors by translating the ligand recognition into measurable signals. The reporting routes are principally built on (i) the sandwich-type mode implementing a pair of aptamers or a combination of an aptamer and an antibody,<sup>[2]</sup> (ii) the intrinsic structural switching activity of a native aptamer<sup>[3]</sup> or (iii) the post-selection engineering of a molecular switch.<sup>[2b,4–8]</sup> Obviously, sandwich platforms (i) are solely dedicated to the determination of macromolecules including proteins.<sup>[2]</sup> On their side, sensors based on the inherent target-induced changes in the oligonucleotide structure (ii) usually require the screening of numerous probes,<sup>[3]</sup> except for those that are derived from aptamers selected for their conformational switch functionality.<sup>[9]</sup> The most popular approach relies on the transformation of existing recognition elements into functional switches (iii) through the rational destabilization of the aptamer structure,<sup>[4]</sup> the aptamer splitting into two

dissociated pieces<sup>[2b,5]</sup> or the aptamer binding to competitor elements such as partially complementary strands,<sup>[6]</sup> polymers<sup>[7]</sup> or nanomaterials.<sup>[8]</sup> The general strategy enables a substantial structural transition from a denatured state in the absence of ligand to the folded conformer upon association with the target. However, the need to precisely know the aptamer motif as well as strong constraints in the secondary structure,<sup>[4,5]</sup> the tedious engineering of aptamer probes and/or competitive strands,<sup>[4,5,10,11]</sup> or the slow reporting kinetics<sup>[6a,12]</sup> are limitations that may be encountered with the previously reported aptamer switches (hereinafter referred to as aptaswitches).<sup>[4b]</sup> It is thus highly desirable to elaborate alternative designs that could address many of these issues and strengthen the arsenal of aptamer-based tools.

The affinity of metal ions for nucleic acids depends in large part on their intrinsic characteristics including valence, size, and coordination geometry.<sup>[13]</sup> With some exceptions (for instance, the peculiar binding of  $K^+$  and  $Na^+$  ions to G-quadruplex motifs), alkali metals interact with nucleic acids through diffuse, non-specific electrostatic association with the negatively charged backbone.<sup>[13a]</sup> In addition to Coulombic interactions, alkaline earth elements preferentially coordinate to the oxygen ligands of phosphates whereas post-transition/transition metal ions form complexes with the electron rich sites of both nucleobases and phosphates (except for soft metal ions such as  $Ag^+$  and  $Hg^{2+}$  that predominantly bind to nucleobase donor centers<sup>[13a]</sup>). According to their preference for base over phosphate binding, metal ions differently influence the overall structure/conformation of nucleic acid molecules.<sup>[13a]</sup> On one hand, alkali and alkaline earth elements exclusively act by stabilizing native duplexes<sup>[13]</sup> and folding single-stranded oligonucleotides<sup>[14]</sup> primarily through the neutralization of the backbone negative charges of polyelectrolytes. On the other hand, at a sufficing metal to nucleotide ratio, many post-transition/transition metal ions are able to cause destabilisation of single- and double-stranded helices<sup>[13,15]</sup> as well as G-quadruplex structures<sup>[16]</sup> by perturbing base-base hydrogen bonding and stacking interactions via the formation of coordinative bonds with the nucleophilic atoms of bases.

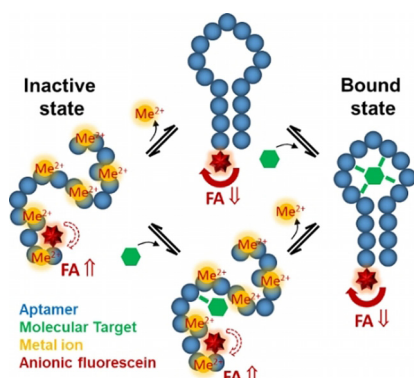
Owing to their pivotal role on the charge screening and folding of nucleic acids,<sup>[13a]</sup> metal ions (most commonly  $Na^+$ ,  $K^+$ , and  $Mg^{2+}$ ) constitute key ingredients of aptamer selection buffers for isolating properly structured receptors.<sup>[17]</sup> As such, the metal ions added as reaction medium components usually dictate the stability of the competent conformer and mediate the molecular recognition of native functional oligonucleotides. However, under these standard conditions of metal ion usage, most existing aptamers do not display a readily perceptible structure-switching activity upon target interaction.<sup>[10,11]</sup>

[\*] B. Billet, B. Chovelon, E. Fiore, F. Oukacine, M.-A. Petrillo, P. Faure, C. Ravelet, E. Peyrin  
DPM UMR 5063, University Grenoble Alpes, CNRS  
38041 Grenoble (France)  
E-mail: corinne.ravelet@univ-grenoble-alpes.fr  
eric.peyrin@univ-grenoble-alpes.fr

B. Billet, B. Chovelon, P. Faure  
Biochemistry, Toxicology and Pharmacology Department, Grenoble site Nord CHU- Biology and Pathology Institute  
38041 Grenoble (France)

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/anie.202102254>.

The present work refers to a different scheme where metal ions are conversely introduced into the working solution to promote the formation of an alternative, inert state of the aptamers and then enhance their potential of structural transition. Typically, the single-stranded chain of an aptamer adopts a binding architecture that relies on a variety of base-pairing (canonical and non-canonical) and base-stacking interactions. Upon exposure to a large enough amount of post-transition/transition elements, the DNA structure is assumed to be disrupted through the strong metal ion complexation of nucleobases.<sup>[13,15,16]</sup> It is speculated that the molecular target binding to its aptamer will disfavour nucleic acid-metal ion interactions, resulting in an effective molecular switch from an inactive, metal ion-complexed state to the active, target-bound conformer (Figure 1).



**Figure 1.** General principle of the post-transition/transition metal ion-regulated aptaswitch. The aptamer architecture is destabilised upon metal ion addition to the working solution, leading to the formation of an inert, metal-complexed state (left). In the presence of molecular target, the equilibrium is shifted towards the folded, molecule-bound DNA form (right). Conformational selection (top) and induced-fit (bottom) binding mechanisms, which may co-exist,<sup>[10]</sup> are depicted through a simplified linkage scheme. The fluorescence anisotropy (FA) readout mode, using an aptamer simply labelled at one extremity by the anionic fluorescein dye, allows monitoring the aptamer switching process.

The fluorescence readout methods constitute one of the most useful approaches in the development of in-solution structural switching platforms.<sup>[2b,3,4,5a,6a,11]</sup> Among them, the fluorescence anisotropy (FA) mode has been widely used due to its attractive features.<sup>[18]</sup> For dye-aptamer conjugates, the overall FA response depends not only on modifications in the effective dimensions of the whole nucleic acid probe (i.e. the global rotational component) but also on alterations in the intrinsic motional freedom of the attached fluorophore (i.e. the local rotational component).<sup>[18]</sup> Herein, we predicted that changes in the charge density of the DNA surrounding the dye, induced by the binding of metal ions, could significantly affect the local contribution of anisotropy,<sup>[19]</sup> thus providing an appropriate way for recording the switching event upon molecular target recognition (Figure 1).

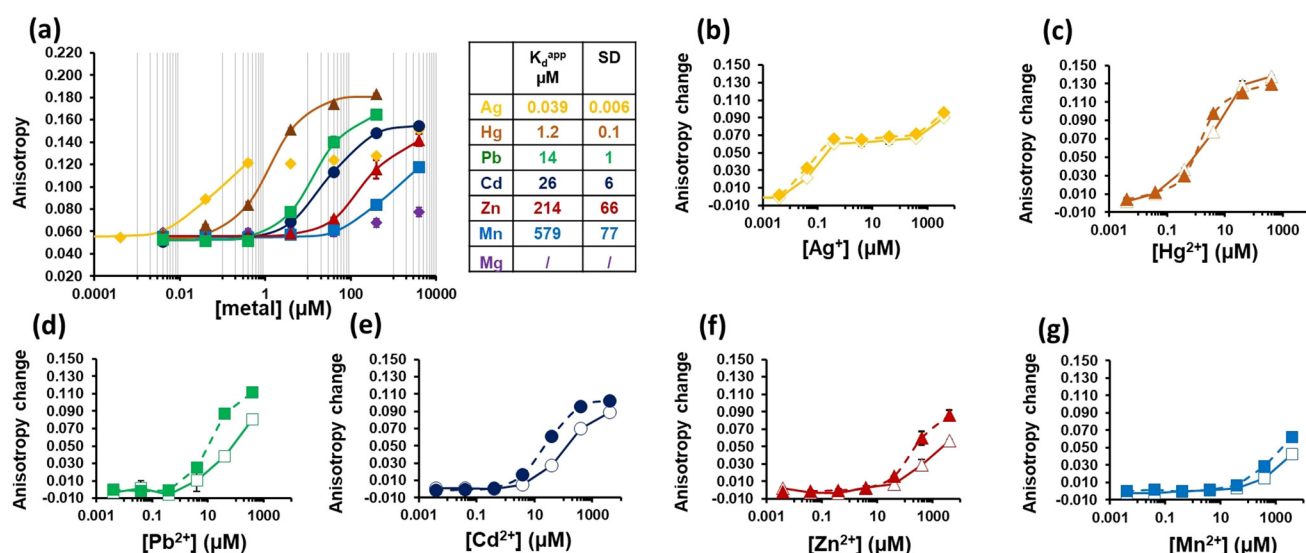
A 23-mer DNA aptamer (apt-T, Table S1) targeting L-tyrosinamide (L-Tym)<sup>[20]</sup> was initially employed to demonstrate the feasibility of the strategy. The DNA was conjugated

at its 3' extremity to fluorescein (3'F-apt-T) to serve as reporter for the FA readout. The anionic fluorescein dye rotates quasi-independently of the whole DNA due to its repulsion from the negatively charged polymer,<sup>[21]</sup> rendering the tracer desirably sensitive to variations in the local electrostatic potential.<sup>[19d,e]</sup> In addition, 3'F-apt-T is a relevant model probe since it generates negligible target-dependent FA changes in the direct signalling format,<sup>[20]</sup> i.e. in the absence of switching elements (Table S2).

By virtue of its very weak metal ion complexation features, the MES buffer (50 mM, pH 6.30,  $[Na^+] \approx 30$  mM) was selected for the binding reaction; moreover, the slightly acidic conditions are suitable for avoiding the precipitation of metal hydroxides. As expected,<sup>[19d,21]</sup> the free 3'F-apt-T tracer exhibited a low FA value ( $r_{free} = 0.055 \pm 0.003$ ). We investigated the effects of six post-transition/transition metal ions, i.e.  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ , and  $Pb^{2+}$  that cover a significant range of base over phosphate complexation preferences,<sup>[13a,15]</sup> on the FA response of the tracer (Figure 2a). For comparison, we also considered the representative  $Mg^{2+}$  alkaline earth ion. The low concentration (20 nM) of 3'F-apt-T was assumed to prevent any metal ion-induced intermolecular association between DNA oligonucleotides.

The addition of increasing amounts of post-transition/transition metal ions led to a great FA enhancement, ranging from about +0.060 for  $Mn^{2+}$  to +0.130 for the most responsive  $Hg^{2+}$  metal ion (Figure 2). For its part,  $Mg^{2+}$  produced a signal output as small as +0.018 at the largest tested concentration. The apparent  $K_d$  for the complexes between DNA and post-transition/transition metal ions varied from the nanomolar to the (sub)millimolar. The decreasing order of 3'F-apt-T affinity was as follows:  $Ag^+ > Hg^{2+} > Pb^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+}$ , mostly obeying the nucleobase coordination preference of these species.<sup>[13a,15b,c]</sup> Further experiments indicated that the increase in 3'F-apt-T anisotropy is conditioned by the metal ion-dependent electrostatic changes in the fluorophore environment (Figures S3, S4). This finding supports the fact that the repulsion between the fluorescein and the backbone is minimised when the metal cations bind to apt-T, which favours contacts with DNA and thus slows down the free motion of the dye.

As the result of the intrinsic low background signal in the free state and the high coupling to the DNA rotation upon binding to metal ions, 3'F-apt-T appeared to be a convenient probe to perform metal ion titration experiments in the presence of target. By comparing with the target-free titration curves (Figures 2b–g), it is visually manifest that insignificant equilibrium shifts occurred with the strongest ( $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ ) or weakest ( $Mn^{2+}$ ) DNA binders. It is likely that the strong affinity of  $Ag^+$  and  $Hg^{2+}$  for nucleobases<sup>[13a,15c]</sup> would disadvantage the target-bound state of 3'F-apt-T while  $Mn^{2+}$  would lead to a poor switching effect due to minor structural alterations.<sup>[15a]</sup> The titration curves of the “intermediate” binders were more substantially right shifted towards higher metal ion concentrations in the presence of L-Tym, in particular that related to  $Pb^{2+}$  (Figure 2d). We then decided to titrate 3'F-apt-T with varying concentrations of L-Tym (0–800  $\mu$ M) using the 50 mM buffer challenged with 40  $\mu$ M  $Pb^{2+}$ . As depicted in Figure S5, the aptaswitch was shown to be



**Figure 2.** a) Fluorescence anisotropy of the 3'F-apt-T probe (20 nM) as a function of the metal ion concentration. The curves were created by fitting the Langmuir model to experimental data. b–g) Post-transition/transition metal ion-dependent anisotropy change without (filled symbols, dashed line:  $r_{\text{metal}} - r_{\text{free}}$ , where  $r_{\text{metal}}$  is the FA signal in the presence of metal ion) or with 1 mM L-Tym (open symbols, full line:  $r_{\text{metal-Tym}} - r_{\text{Tym}}$ , where  $r_{\text{Tym}}$  and  $r_{\text{metal-Tym}}$  are the FA signal in the presence of target alone and both metal ion and target, respectively). 50 mM MES buffer.

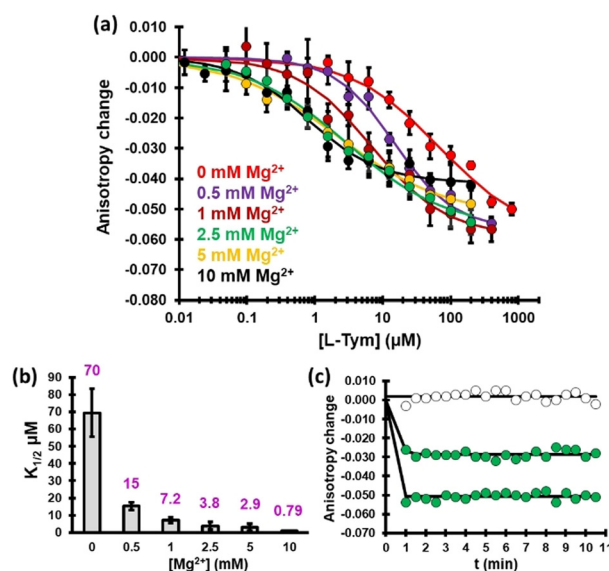
specifically activated by the target binding. Interestingly, the switching system was equally responsive with the 5' end-tagged DNA probe (5'F-apt-T, Figure S7).

We subsequently aimed at optimizing the assay performances. Due to its stabilizing effects on the active conformation of apt-T,  $\text{Mg}^{2+}$  favours the L-Tym binding to its DNA receptor.<sup>[20]</sup> We first evaluated the influence of adding  $\text{Mg}^{2+}$  to the 50 mM buffer on the response of 3'F-apt-T. However, a deterioration in both assay precision and signal amplitude was observed with the  $\text{Mg}^{2+}$  concentration increasing (Figure S8).

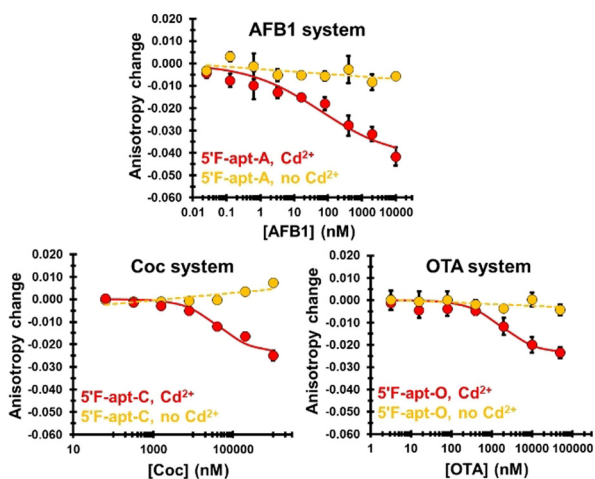
We then reasoned that a reduction in the concentration of the buffer (and consequently  $\text{Na}^+$ ) could, by facilitating the  $\text{Pb}^{2+}$  access to DNA,<sup>[13a,15a]</sup> populate the non-competent form and thus improve the FA output.<sup>[22]</sup> Whatever the added  $\text{Mg}^{2+}$  amount, the 5-fold decrease in the MES concentration (10 mM,  $[\text{Na}^+] \approx 6$  mM) actually yielded a greater maximum response (Figure 3a vs. Figures S5, S8). Although a consistent loss in the apparent affinity occurred<sup>[22]</sup> (Figure 3b vs. Figures S5, S8, see for  $[\text{Mg}^{2+}] = 0$  and 0.5 mM), the aptaswitch still exhibited  $K_{1/2}$  values within the low-/sub-micromolar range for  $[\text{Mg}^{2+}] \geq 2.5$  mM (reasonably close to the  $K_d$  of 0.3–0.8  $\mu\text{M}$  measured at 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ <sup>[20]</sup>). A valuable compromise between maximal response, affinity, and dynamic range (Figures 3, S9, S10) was attained over the 2.5–5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  range, offering useful analytical features (Figure S11 and Table S3). In addition, the activation of 3'F-apt-T was roughly completed within  $\approx 1$  min (Figure 3c), demonstrating that the sensor possesses a high speed of responsivity partly attributable<sup>[11]</sup> to the very fast ligand exchange rates of switching metal ion.<sup>[13a,23]</sup>

The ability of our switching strategy to operate with other types of functional DNA and targets was next assessed. We focused on widely used hairpin (apt-A), imperfect hairpin (apt-P), three-way junction (apt-C) or G-quadruplex (apt-O)

aptamers (Table S1) targeting aflatoxin B1 (AFB1), adenosine 5'-triphosphate (ATP), cocaine (Coc) or ochratoxin A (OTA), respectively. We employed 5' end-tagged probes that induce no or minimal response in direct configuration (Figures 4, S16). Even without in-depth assay optimization, the  $\text{Cd}^{2+}$ -regulated AFB1, Coc and OTA switches specifically signalled the presence of their molecular targets (Figures 4, S13, S18), yet with different FA outputs. For its part, the apt-P



**Figure 3.** a) Anisotropy change ( $r_{\text{metal-Tym}} - r_{\text{metal}}$ ) of 3'F-apt-T (20 nM) as a function of L-Tym concentration. 10 mM MES buffer, 40  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$ , and various  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations. The curves were created by fitting the Hill model to experimental data. b)  $\text{Mg}^{2+}$  concentration dependence of  $K_{1/2}$ . c) Real-time monitoring (at 2.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ) for various L-Tym concentrations: 0, 1.5 and 200  $\mu\text{M}$  from top to bottom. The curves were created by fitting the kinetic model to experimental data.



**Figure 4.** Anisotropy change of 5'F-apt-A (20 nM), 5'F-apt-C and 5'F-apt-O (30 nM) probes as a function of analyte concentration ( $r_{\text{analyte}} - r_{\text{free}}$  in the absence of  $\text{Cd}^{2+}$  or  $r_{\text{metal-analyte}} - r_{\text{metal}}$  in the presence of  $40 \mu\text{M Cd}^{2+}$ ). Binding buffer: 10 mM MES for 5'F-apt-C or 50 mM MES containing  $0.5 \text{ mM Mg}^{2+}$  for the two other probes. Further experimental details and discussion are in Supporting Information.

aptaswitch exhibited non-specific anisotropy changes in the presence of ATP due to the great competition between the analyte and the oligonucleotide for the  $\text{Cd}^{2+}$  or  $\text{Pb}^{2+}$  binding<sup>[13a]</sup> (Figures S16, S17). This suggests that our approach could not be amenable to compounds displaying strong metal ion coordination properties.

We finally established that the switch design has the potential for detecting analytes in biological environments under dilute conditions (Figure S19). Considering furthermore that (a) the FA output can be completed within a short period of time (Figures 3, S14) and (b) portable FA-based devices are now commercially available,<sup>[24]</sup> it might be conceivable that the sensor will be adaptable to point-of-care tests.

In summary, we have introduced a new class of aptaswitches that holds great promise for enriching the toolbox of aptamer-based devices. The system is characterized by an outstanding ease of use as it only requires the introduction of one additional metal ion into standard aptamer binding media. Unlike direct signalling aptamers, which generally impose the tedious and expensive labelling on precise internal sites<sup>[3,19c]</sup> (Table S2), the current approach simply operates with DNA probes bearing a fluorescein dye attached to the extremity, regardless of its 3' or 5' position. It reports molecular recognition for diversely structured aptamers and the peculiar nature of the reporting route may provide opportunities to enlarge the assay dynamic range (Supporting Information).

Given that the aptaswitch primarily relies on modifications in the electrostatics, the strategy could be adaptable to a variety of label-free platforms that report on changes in the surface charge density of functional DNA, including electrochemical and field-effect transistor devices.<sup>[6c,9]</sup>

## Acknowledgements

We acknowledge the support of NeuroCoG (ANR-15-IDEX-02), Labex Arcane and CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003), and Polynat Carnot Institute (ANR-11-CARN-007-01).

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** aptamer · fluorescence anisotropy · metal ion · molecular target · structural switch

- [1] M. R. Dunn, R. M. Jimenez, J. C. Chaput, *Nat. Rev. Chem.* **2017**, *1*, 76.
- [2] a) Y. Kang, K. J. Feng, J. W. Chen, J. H. Jiang, G. L. Shen, R. Q. Yu, *Bioelectrochemistry* **2008**, *73*, 76–81; b) S. B. Ebrahimi, D. Samanta, H. F. Cheng, L. I. Nathan, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 13744–13748.
- [3] a) S. D. Jhaveri, R. Kirby, R. Conrad, E. J. Maglott, M. Bowser, R. T. Kennedy, G. Glick, A. D. Ellington, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2469–2473; b) E. J. Merino, K. M. Weeks, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12766–12767.
- [4] a) M. N. Stojanovic, P. de Prada, D. W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4928–4931; b) G. Durand, S. Lisi, C. Ravelet, E. Dausse, E. Peyrin, J. J. Toulmé, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 6942–6945; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7062–7065.
- [5] a) M. N. Stojanovic, P. de Prada, D. W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11547–11548; b) X. Zuo, Y. Xiao, K. W. Plaxco, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6944–6945.
- [6] a) R. Nutiu, Y. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4771–4778; b) J. Liu, Y. Lu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 90–94; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 96–100; c) J. Das, K. B. Cederquist, A. A. Zaragoza, P. E. Lee, E. H. Sargent, S. O. Kelley, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 642–648.
- [7] a) H. A. Ho, M. Leclerc, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1384–1387; b) F. Xia, X. Zuo, R. Yang, Y. Xiao, D. Kang, A. Vall -Bélisle, X. Gong, J. D. Yuen, B. B. Hsu, A. J. Heeger, K. W. Plaxco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 10837–10841.
- [8] a) X. Liu, F. Wang, R. Aizen, O. Yehezkeili, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11832–11839; b) J. J. Zhang, Z. Li, S. Zhao, Y. Lu, *Analyst* **2016**, *141*, 4029–4034; c) Y. Jiang, M. Shi, Y. Liu, S. Wan, C. Cui, L. Zhang, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 11916–11920; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 12078–12082.
- [9] N. Nakatsuka, K. A. Yang, J. M. Abendroth, K. M. Cheung, X. Xu, H. Yang, C. Zhao, B. Zhu, Y. S. Rim, Y. Yang, P. S. Weiss, M. N. Stojanovic, A. M. Andrews, *Science* **2018**, *362*, 319–324.
- [10] J. D. Munzar, A. Ng, D. Juncker, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 1390–1419.
- [11] B. D. Wilson, A. A. Hariri, I. A. P. Thompson, M. Eisenstein, H. T. Soh, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5079.
- [12] H. Chang, L. Tang, Y. Wang, J. Jiang, J. Li, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2341–2346.
- [13] a) “Bioorganic Chemistry. Part I: Nucleic Acids”: S. A. Kazakov in *Nucleic Acid Binding and Catalysis by Metal Ions* (Ed.: S. M. Hecht), Oxford University Press, New York, **1996**; b) W. Zhou, R. Saran, J. Liu, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 8272–8325.
- [14] a) S. Doose, H. Barsch, M. Sauer, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 1224–1234; b) H. Chen, S. P. Meisburger, S. A. Pabit, J. L. Sutton, W. W. Webb, L. Pollack, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 799–804.



- [15] a) Y. A. Shin, J. M. Heim, G. L. Eichhorn, *Bioinorg. Chem.* **1972**, *1*, 149–163; b) J. Duguid, V. A. Bloomfield, J. Benevides, G. J. Thomas, Jr., *Biophys. J.* **1993**, *65*, 1916–1928; c) E. V. Hackl, S. V. Kornilova, Y. P. Blagoi, *Int. J. Biol. Macromol.* **2005**, *35*, 175–191.
- [16] S. W. Blume, V. Guarcello, W. Zacharias, D. M. Miller, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 617–625.
- [17] N. Rupcich, W. Chiuman, R. Nutiu, S. Mei, K. K. Flora, Y. Li, J. D. Brennan, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 780–790.
- [18] a) S. Perrier, V. Guieu, B. Chovelon, C. Ravelet, E. Peyrin, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 4236–4248; b) Q. Zhao, J. Tao, J. S. Uppal, H. Peng, H. Wang, X. C. Le, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2019**, *110*, 401–409.
- [19] a) A. Juskowiak, E. Galezowska, A. Zawadzka, A. Gluszynska, S. Takenaka, *Spectrochim. Acta Part A* **2006**, *64*, 835–843; b) J. Ruta, S. Perrier, C. Ravelet, J. Fize, E. Peyrin, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7468–7473; c) Q. Zhao, Q. Lv, H. Wang, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 1238–1245; d) M. Zou, Y. Chen, X. Xu, H. Huang, N. Li, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *32*, 148–154; e) A. Lopez, J. Liu, *Langmuir* **2019**, *35*, 9954–9961; f) S. Perrier, C. Ravelet, V. Guieu, J. Fize, B. Roy, C. Perigaud, E. Peyrin, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1652–1657.
- [20] L. Challier, R. Miranda-Castro, B. Barbe, C. Fave, B. Limoges, E. Peyrin, C. Ravelet, E. Fiore, P. Labbé, L. Coche-Guérente, E. Ennifar, G. Bec, P. Dumas, F. Mavré, V. Noël, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 11963–11971.
- [21] J. R. Unruh, G. Gokulrangan, G. H. Lushington, C. K. Johnson, G. S. Wilson, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 3455–3465.
- [22] A. Vallée-Bélisle, F. Ricci, K. W. Plaxco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13802–13807.
- [23] W. Li, Z. Zhang, W. Zhou, J. Liu, *ACS Sens.* **2017**, *2*, 663–669.
- [24] O. D. Hendrickson, N. A. Taranova, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev, S. A. Eremin, *Sensors* **2020**, *20*, 7132.

Manuscript received: February 13, 2021

Accepted manuscript online: March 20, 2021

Version of record online: April 21, 2021

## SUPPORTING INFORMATION

## Table of Contents

<b>Experimental procedures</b>	(S2)
A. Reagents	(S2)
B. DNA oligonucleotides used in the present work	(S2)
→ Table S1. List of DNA probes	(S2)
→ Scheme S1. Secondary structures of aptamers	(S2)
C. Measurements and data analysis	(S2)
D. Experiments for the L-Tym aptaswitch	(S3)
D.a. Metal titration of 3'F-apt-T	(S3)
D.b. Dose-response curves	(S3)
D.c. Real-time monitoring	(S3)
E. Experiments for other aptaswitches	(S3)
F. Experiments for the analysis of realistic samples	(S3)
<b>Additional results and discussion</b>	(S4)
A. General response features of end-labelled small-molecule aptamers in direct FA signalling scheme	(S4)
→ Table S2. Summary of direct FA responses for a variety of aptamer probes	(S4)
B. L-Tym aptaswitch	(S5)
B.a. Comparison between metal ion-induced FA and FI variations for 3'F-apt-T (50 mM MES buffer)	(S5)
→ Figure S1. Relative change in FA and FI for 3'F-apt-T	(S5)
→ Figure S2. Relative FA change vs relative FI change for 3'F-apt-T	(S5)
B.b. Implication of the metal ion binding-based electrostatic changes in the FA increase of 3'F-apt-T (50 mM MES buffer)	(S6)
→ Figure S3. FA change for differently sized fluorescein-DNA conjugates in the presence or absence of metal ions	(S6)
→ Figure S4. Metal ion-induced FA change for 3'TR-apt-T	(S7)
B.c. Pb <sup>2+</sup> -regulated aptaswitch (50 mM MES buffer)	(S8)
<i>B.c.1. Dose-response curves, specificity analysis and comparison with the direct signalling format</i>	(S8)
→ Figure S5. Target-induced FA change for 3'F-apt-T in the presence or absence of Pb <sup>2+</sup> and specificity analysis	(S8)
→ Figure S6. Pb <sup>2+</sup> -induced FA change for 3'F-apt-T and 3'F-apt-A	(S8)
→ Figure S7. Target-induced FA change for 5'F-apt-T in the presence or absence of Pb <sup>2+</sup>	(S9)
<i>B.c.2. Mg<sup>2+</sup> effects on the responsivity of 3'F-apt-T</i>	(S10)
→ Figure S8. Target-induced FA change for the 3'F-apt-T aptaswitch in the presence of different Mg <sup>2+</sup> concentrations	(S10)
B.d. L-Tym-induced activation process of the aptaswitch	(S11)
→ Figure S9. Mg <sup>2+</sup> concentration dependence of Hill slope (3'F-apt-T, 10 mM MES buffer)	(S11)
→ Figure S10. Proposed model of multistage activation pathway	(S11)
B.e. Analytical features of the Pb <sup>2+</sup> -regulated 3'F-apt-T aptaswitch (10 mM MES buffer)	(S12)
→ Figure S11. Calibration curves in the presence of 2.5 and 5 mM Mg <sup>2+</sup> , and FA vs FI readout modes	(S12)
→ Table S3. LOD and dynamic range for previously reported L-Tym aptasensors	(S12)
C. Other aptaswitches	(S13)
C.a. Control probes for the specificity examination of aptaswitches	(S13)
→ Figure S12. FA change of DNA probes upon addition of Pb <sup>2+</sup> or Cd <sup>2+</sup>	(S13)
C.b. AFB1 aptaswitch	(S14)
→ Figure S13. Specificity analysis	(S14)
→ Figure S14. Real-time monitoring of AFB1 using 5'F-apt-A in the presence of Cd <sup>2+</sup>	(S14)
→ Figure S15. Target-induced FA change for 3'F-apt-A in the presence or absence of Cd <sup>2+</sup>	(S15)
C.c. ATP aptaswitch	(S16)
→ Figure S16. ATP-induced FA change for 5'F-apt-P in the presence or absence of Pb <sup>2+</sup> or Cd <sup>2+</sup> and specificity analysis	(S16)
→ Figure S17. Ade-induced FA change for 5'F-apt-P in the presence of Pb <sup>2+</sup> or Cd <sup>2+</sup> and specificity analysis	(S16)
C.d. Coc and OTA aptaswitches	(S17)
→ Figure S18. Specificity analysis	(S17)
D. Overview of the apparent affinities for aptaswitches	(S18)
→ Table S4. K <sub>1/2</sub> vs literature K <sub>d</sub> for different systems	(S18)
E. Study of the aptaswitch functionality in realistic samples	(S19)
→ Figure S19. Response of L-Tym and Coc aptaswitches in diluted urine samples	(S19)
<b>References</b>	(S20)
<b>Author contributions</b>	(S20)

## SUPPORTING INFORMATION

## Experimental Procedures

## A. Reagents

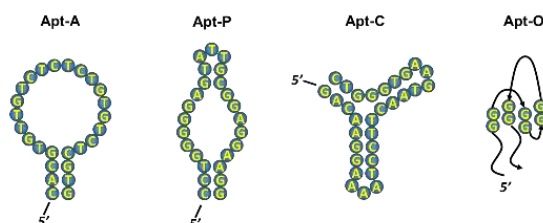
L-tyrosinamide (L-Tym), aflatoxin B1 (AFB1), adenosine 5'-triphosphate (ATP), guanosine 5'-triphosphate (GTP), adenosine (Ade), ochratoxin A (OTA), N-acetyl-L-phenylalanine (NAP), 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES), PbCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, and MnCl<sub>2</sub> were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Cocaine (Coc) and benzoylecgonine (BZE) were supplied by Lipomed AG (Arllesheim, Switzerland). D-tyrosinamide (D-Tym) was provided from Iris Biotech (Marktredwitz, Germany). MgCl<sub>2</sub> was ordered from Roth (Lauterbourg, France). HgCl<sub>2</sub> and ZnCl<sub>2</sub> were supplied by ProLabo (Paris, France). AgNO<sub>3</sub>, NaOH and methanol were received from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). Water was obtained using a Direct-Q® 3UV water purification system (Merck Millipore, Guyancourt, France). The stock solutions of metal ions and most analytes were prepared in pure water. AFB1 and OTA were dissolved in methanol to obtain stock solutions. As AFB1 undergoes light degradation, the mycotoxin solution was kept in the dark when not used. The MES buffers were prepared to the desired pH (6.30) by titrating the free acid with sodium hydroxide. Labelled DNA oligonucleotides were synthesized, HPLC-purified (except the long 63-mer DNA molecule that was PAGE-purified) and identified by MALDI-TOF mass spectrometry by Eurogentec (Seraing, Belgium). The stock solutions of oligonucleotides were prepared in pure water at 10<sup>-3</sup> M and stored at -20°C until use.

## B. DNA oligonucleotides used in the present work

**Table S1.** List of DNA probes used for the aptaswitch design and size-based analysis. For the size-based analysis (Figure S3), the oligonucleotides were derived from apt-T, sharing a common 13-base region at the 3' end (in bold face). The end-attached fluorophore is red colored (F: fluorescein; TR: Texas-Red).

Aptaswitch design	DNA length	Secondary structure	5' → 3'
apt-T (L-Tym)	23-mer	Unknown <sup>[S1]</sup>	TGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCC-F F-TGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCC TGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCC-TR
apt-A (AFB1)	26-mer	Hairpin <sup>[S2]</sup>	CACGTGTTGTCTCTCTGTGTCTCGTG-F F-CACGTGTTGTCTCTCTGTGTCTCGTG
apt-P (ATP)	25-mer	Imperfect hairpin <sup>[S3]</sup>	F-CCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGG
apt-C (Coc)	30-mer	Three-way junction <sup>[S4]</sup>	F-GACAAGGAAAATCCTTCAATGAAGTGGTC
apt-O (OTA)	31-mer	Antiparallel G-quadruplex <sup>[S5]</sup>	F-GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGAGCATC
<b>Size-based analysis</b>			
13-SBA	13-mer	/	<b>GAGTGCGGTGCC-F</b>
23-SBA (apt-T)	23-mer	/	TGTGGTGTGT <b>GAGTGCGGTGCC-F</b>
33-SBA	33-mer	/	CTTGGATTGATGTGGTGTGT <b>GAGTGCGGTGCC-F</b>
43-SBA	43-mer	/	CTAGCTGGAGCTTGGATTGATGTGGTGTGT <b>GAGTGCGGTGCC-F</b>
53-SBA	53-mer	/	GCCCAATTCGCTAGCTGGAGCTTGGATTGATGTGGTGTGT <b>GAGTGCGGTGCC-F</b>
63-SBA	63-mer	/	TGAGTGCGGTGCCCAATTCGCTAGCTGGAGCTTGGATTGATGTGGTGTGT <b>GAGTGCGGTGCC-F</b>

**Scheme S1.** Secondary structure of aptamers.



## C. Measurements and data analysis

Fluorescence intensity and anisotropy readings were taken on a Tecan Infinite F500 microplate reader (Mannedorf, Switzerland) using black, 96-well Greiner Bio-One microplates (Courtaboeuf, France). Excitation was set at 485 or 585 nm, and emission was collected at 535 or 635 nm for the fluorescein- and Texas Red-tagged oligonucleotides, respectively. The fluorescence anisotropy (*r*) and the total fluorescence intensity (*I*) were determined by the instrument software as previously described.<sup>[S6,S7]</sup> All the fitting procedures were completed with the Excel Solver algorithm (least squared method) by analysing each dose-response curve from at least three independent experiments.

According to the analysis of bulk binding data for metal ion-nucleic acid complexes,<sup>[S8]</sup> the fitting to the experimental metal ion titration curves was proceeded using the following Langmuir equation:

$$r_{\text{metal}} = r_{\text{free}} + \frac{r_{\text{metal}}^{\text{max}} - r_{\text{free}}}{1 + \frac{K_d^{\text{app}}}{c_{\text{metal}}}} \quad (1)$$

where  $r_{\text{free}}$  and  $r_{\text{metal}}$  are the FA signal in the absence or presence of metal ion in varying concentrations, respectively,  $r_{\text{metal}}^{\text{max}}$  is the maximal FA signal upon metal ion binding,  $K_d^{\text{app}}$  is the apparent dissociation constant of the metal ion-DNA complex, and  $c_{\text{metal}}$  is the total concentration of metal ion added to the reaction solution. Raw anisotropy data were used without correction for quantum yield changes<sup>[S9]</sup> as metal ion-induced fluorescence intensity (FI) variations were somewhat erratic and, with the exception of Ag<sup>+</sup>, of limited

## SUPPORTING INFORMATION

amplitude (Figures S1 and S2). Moreover, regarding the peculiar  $\text{Ag}^+$  behaviour, the considered concentration range for the curve fitting was limited to 0-0.4  $\mu\text{M}$ , where no FI change was detected (Figure S1). In addition, as the approximation in equation 1 (total metal ion concentration  $\approx$  free metal ion concentration) is not valid for the  $\text{Ag}^+$  binding to DNA, we used the non-simplified Langmuir model<sup>[S1]</sup> for estimating the  $K_d^{\text{app}}$  value. Of note, the biphasic FA variation in the  $\text{Ag}^+$  titration curve (Figure 2a) would suggest the formation of further metal ion-DNA complexes of much higher dissociation constant.<sup>[S10]</sup> In the case of the  $\text{Mg}^{2+}$  titration curve, no data fitting was undertaken due to the weak anisotropy variation.

The experimental dose-response curves for the responsive probes were modelled through the empirical Hill equation:

$$r_{\text{metal-target}} - r_{\text{metal}} = \frac{r_{\text{metal-target*min}} - r_{\text{metal}}}{1 + \left(\frac{K_{1/2}}{c_{\text{target}}}\right)^n} \quad (2)$$

where  $r_{\text{metal-target}}$  is the FA signal in the presence of both target in varying concentrations and metal ion at a fixed concentration,  $r_{\text{metal-target*min}}$  is the minimal FA signal upon target binding,  $K_{1/2}$  is the target concentration needed to obtain 50% of the absolute signal gain,  $n$  is the Hill slope, and  $c_{\text{target}}$  is the total concentration of target added to the reaction solution.

The fitting to the experimental kinetic data was accomplished according to the following equation:

$$r_{\text{metal-target}} - r_{\text{metal}} = (r_{\text{metal-target*min}} - r_{\text{metal}})(1 - e^{-kt}) \quad (3)$$

where  $k$  is the rate of aptaswitch activation and  $t$  is the time. The time required to reach the half-maximal anisotropy signal ( $t_{1/2}$ ) was estimated from the  $k$  value as follows:  $t_{1/2} = \ln(2)/k$ .

## D. Experiments for the L-Tym aptaswitch

### D.a. Metal titration of 3'F-apt-T

The binding buffer consisted of 50 mM MES, pH 6.30. Two working aptamer solutions were obtained by adequate dilution of the stock solution in 10X concentrated binding buffer, with or without L-Tym. Prior to the first utilization, the working solutions were heated at 80°C for 5 min and left to stand at room temperature for 30 min in the dark. Successive dilutions of each metal stock solution were made in the binding buffer. The aptamer and metal ion working solutions were mixed into the individual wells of a microplate (final volume = 100  $\mu\text{L}$ ). All experiments were done at 23°C. Blank wells received 100  $\mu\text{L}$  of the binding buffer. Each well on at least the first three rows then received 50  $\mu\text{L}$  of the aptamer solution and 50  $\mu\text{L}$  of the metal ion solution. On at least three other rows, each well received 50  $\mu\text{L}$  of the aptamer solution challenged with 1 mM L-Tym (final concentration) and 50  $\mu\text{L}$  of the metal ion solution. The final concentration of the aptamer probe and metal ions was 20 nM and from 0 to 4000  $\mu\text{M}$ , respectively. Specifically, the highest concentration for  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$  was set to 400  $\mu\text{M}$ . Indeed, at 4 mM, these metal ions began to significantly quench the fluorescence of the tracer (up to 45% and 60% FI quenching for  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$ , respectively) and thus precluded reliable FA measurements. The microplate was then placed into the microplate reader for FA measurements.

### D.b. Dose-response curves

Successive dilutions of L- or D-Tym stock solutions were made in the binding buffer. The solutions of oligonucleotide and Tym (final concentration from 0 to 800  $\mu\text{M}$ ) were mixed in the presence of  $\text{PbCl}_2$  (final concentration = 40  $\mu\text{M}$ ) before reading (final volume = 100  $\mu\text{L}$ ). Regarding sensor optimization experiments, we used either the 50 mM or 10 mM MES buffer at the same pH following the aforementioned protocol, except that  $\text{MgCl}_2$  was added to the aptamer working solution at a final concentration up to 10 mM.

### D.c. Real-time monitoring

The solutions of 3'F-apt-T and target (final concentration of 0, 1.5 or 200  $\mu\text{M}$ ) were mixed in the 10 mM MES binding buffer containing  $\text{MgCl}_2$  (final concentration = 2.5 mM) and  $\text{PbCl}_2$  (final concentration = 40  $\mu\text{M}$ ) and the reading process was started as quickly as possible (delay time of about 1 min after manual introduction of the microplate into the reader). FA measurements were performed through a kinetic run during 10 min, with an interval time of 30 s between two successive readings.

## E. Experiments for other aptaswitches

All the experiments were conducted similarly to those described for the L-Tym aptaswitch. Only small adjustments in the assay implementation and reactional medium were made, as summarized below:

System	Switching ion	metal	Binding buffer (pH = 6.30)	Target concentration range	Non-binding DNA*	Non-cognate compound
AFB1**/***	40 $\mu\text{M}$ $\text{Cd}^{2+}$		50 mM MES + 0.5 mM $\text{Mg}^{2+}$	0-10 $\mu\text{M}$	5'F-apt-T	OTA <sup>[S2]</sup>
ATP**	40 $\mu\text{M}$ $\text{Cd}^{2+}$ or $\text{Pb}^{2+}$		50 mM MES + 0.5 mM $\text{Mg}^{2+}$	0-1 mM	5'F-apt-O or 3'F-43-SBA	GTP <sup>[S11]</sup>
Coc	40 $\mu\text{M}$ $\text{Cd}^{2+}$		10 mM MES	0-1 mM	3'F-apt-T	BZE <sup>[S12]</sup>
OTA**	40 $\mu\text{M}$ $\text{Cd}^{2+}$		50 mM MES + 0.5 mM $\text{Mg}^{2+}$	0-50 $\mu\text{M}$	5'F-apt-P	NAP <sup>[S13]</sup>

\* The control DNA probes were selected in relation to their overall response upon addition of  $\text{Pb}^{2+}$  or  $\text{Cd}^{2+}$  metal ions (Figure S12).

\*\*  $\text{Mg}^{2+}$  was added to the reaction solution as the molecular recognition process is known to be dependent on the presence of alkaline earth metal ions for these three aptamers.

\*\*\* The FA reading was taken after at least 5 minutes of sample incubation (Figure S14). In order to prevent mycotoxin solubility problems, the maximal concentration employed for the calibration curve was set to 10  $\mu\text{M}$ .

## F. Experiments for the analysis of realistic samples

Pooled human urine (batch number: 20BC05) was purchased from ProBioQual (Lyon, France). The urine sample was first centrifuged at 6100 rpm for 10 min. The supernatant was then filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  membranes and diluted in the 10 mM MES buffer spiked with L-Tym (final concentration from 0 to 800  $\mu\text{M}$ ). Three replicate samples were analyzed by using the 3'F-apt-T probe in the presence of 40  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  and 2.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . We carried out similar binding experiments for Coc (final concentration from 0 to 1 mM) in urine samples diluted in the 10 mM MES buffer by implementing the 5'F-apt-C probe in the presence of 40  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ .

## SUPPORTING INFORMATION

## Additional results and discussion

## A. General response features of end-labelled small-molecule aptamers in direct FA signalling scheme

Similarly to what is reported in fluorescence intensity-based transduction,<sup>[S4,S14,S15]</sup> end-labelled aptamers dedicated to small molecules are most often unable to generate a substantial FA output under the direct reporting configuration, *i. e.* in the absence of switching elements (Table S2). This arises from marginal target-induced structural alterations in the terminal DNA regions, then determining limited and random changes in the local rotational component of anisotropy. As a consequence, the design of more responsive probes generally imposes the tedious and expensive screening of numerous aptamer conjugates that incorporate the fluorescent reporter at internal positions, in the vicinity of the target binding site.<sup>[S2,S16-S18,S20,S21]</sup> One representative counter-example is the 49-mer version of the L-Tym aptamer that, when specifically tagged at its 3' extremity by the fluorescein dye, causes a significant FA signal gain (of about +0.040 upon target binding at ambient temperature).<sup>[S6]</sup>

**Table S2.** Summary of direct FA responses from the previously reported end-labelled small-molecule aptamers and from the probes used in the present work.

Aptamer	Dye nature and location	Maximal absolute FA change	References
<b>L-Tym</b>			
23-mer (apt-T)	3'-F	< 0.010; < 0.010	[S1]; this work
23-mer (apt-T)	5'-F	~0.015	this work
49-mer	3'-F	~0.040	[S6]
49-mer	5'-F	< 0.010	[S6]
49-mer	3'-TR	~0.010	[S6]
49-mer	5'-TR	< 0.010	[S6]
<b>AFB1</b>			
26-mer (apt-A)	3'-F	< 0.010	this work
26-mer (apt-A)	5'-F	< 0.010	this work
50-mer	3'-TMR*	< 0.010	[S2]
50-mer	5'-TMR	< 0.010	[S2]
<b>ATP/Ade</b>			
25-mer (apt-P)	5'-F	< 0.010	this work
25-mer (apt-P)	3'-F	< 0.010	[S3]
25-mer (apt-P)	3'-TMR	< 0.010	[S16]
25-mer (apt-P)	5'-TMR	< 0.010	[S16]
23-mer	3'-F	~0.015	[S3]
21-mer	3'-TR	< 0.010	[S3]
21-mer	3'-F	~0.025	[S3]
<b>Cocaine</b>			
30-mer (apt-C)	5'-F	< 0.010	this work
30-mer (apt-C)	3'-TMR	< 0.010	[S17]
30-mer (apt-C)	5'-TMR	~0.020	[S17]
<b>OTA</b>			
31-mer (apt-O)	5'-F	< 0.010	this work
36-mer	3'-TMR	~0.020	[S18]
36-mer	5'-TMR	~0.010	[S18]
36-mer	5'-F	< 0.010	[S19]
<b>L-Arm</b>			
24-mer	5'-F	~0.020	[S6]
24-mer	3'-F	~0.025	[S6]
<b>Vasopressin</b>			
55-mer	3'-TMR	< 0.010	[S20]
55-mer	5'-TMR	< 0.010	[S20]
<b>Bisphenol A</b>			
35-mer	3'-TMR	< 0.010	[S21]
35-mer	5'-TMR	~0.015	[S21]

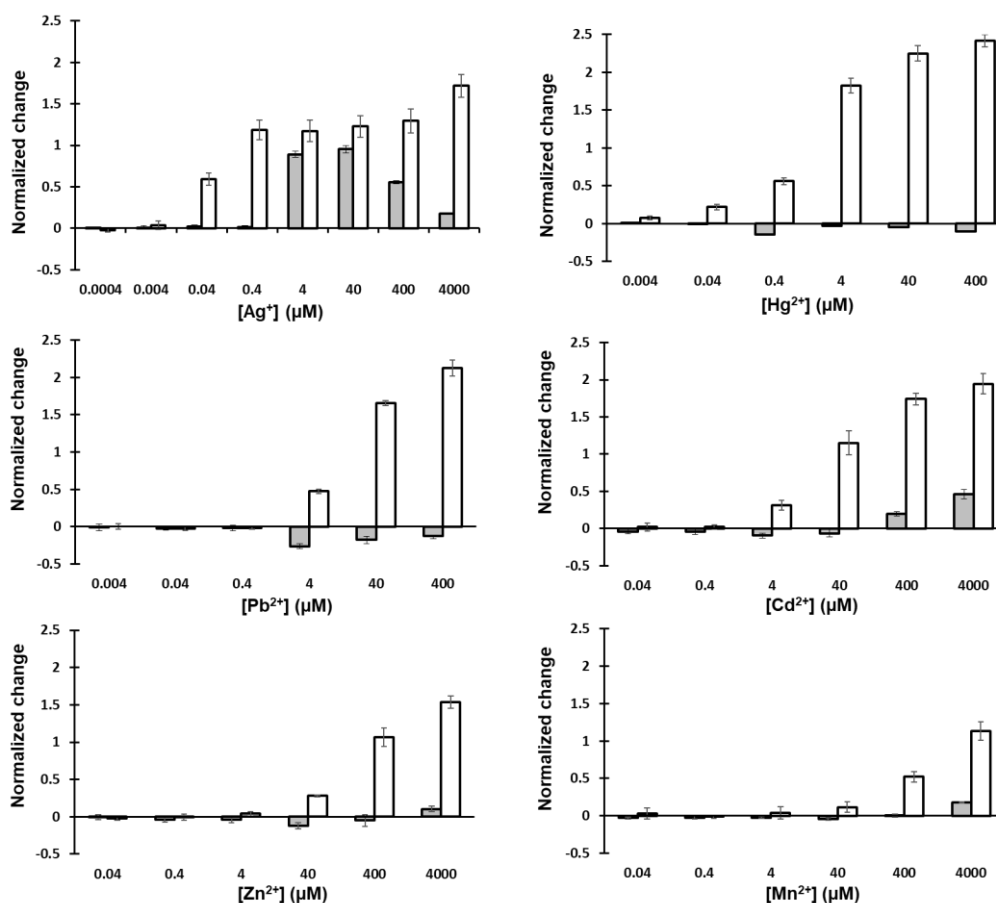
\* TMR: tetramethylrhodamine

## SUPPORTING INFORMATION

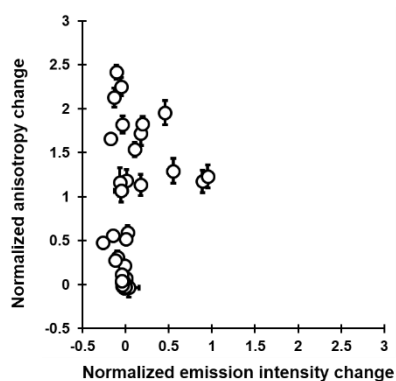
## B. L-Tym aptaswitch

## B.a. Comparison between metal ion-induced FA and FI variations for 3'F-apt-T (50 mM MES buffer)

Anisotropy responses of 3'F-apt-T in the presence of post-transition/transition metal ions were compared with those of total fluorescence intensity ( $I_t$ ). To achieve that, both  $r$  and  $I_t$  variations were normalized and then plotted against the metal ion concentration (Figure S1). It was shown that the extent of FI changes is much smaller than that of FA variations, except within the 4-40  $\mu\text{M}$   $[\text{Ag}^+]$  range. Overall, due to the lack of an evident relationship between FI data and metal ion dose, no linkage was discernible between the  $r$  and  $I_t$  responses (Figure S2).



**Figure S1.** Normalized changes in anisotropy ( $(r_{\text{metal}} - r_{\text{free}})/r_{\text{free}}$ , white bars) and total emission intensity ( $(I_{t-\text{metal}} - I_{t-\text{free}})/I_{t-\text{free}}$ , grey bars) as a function of the post-transition/transition metal ion concentration for the 3'F-apt-T probe. MES buffer concentration = 50 mM. Error bars represent the standard deviation from at least three independent experiments.



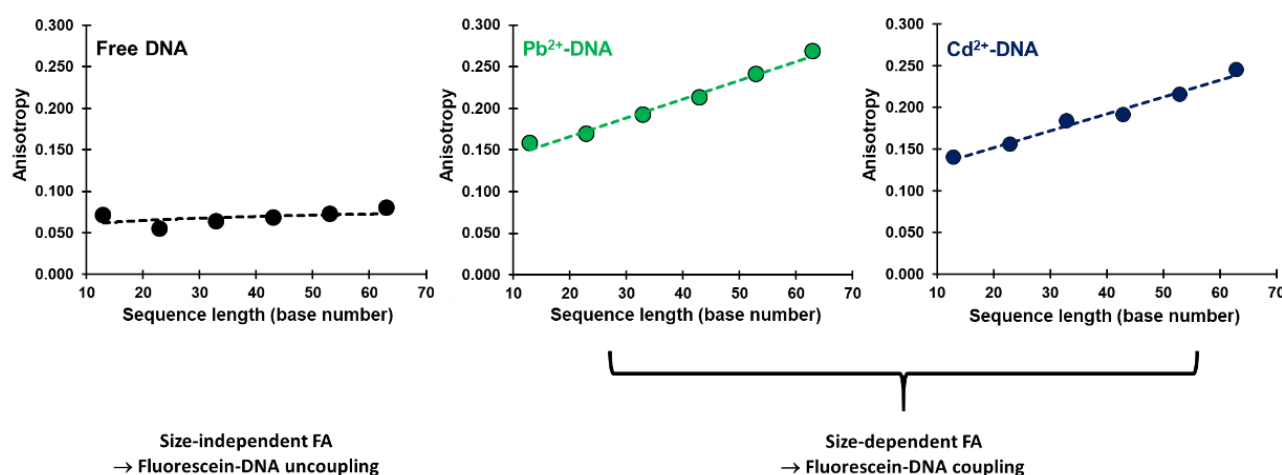
**Figure S2.** Plot of relative anisotropy changes against relative emission intensity changes considering all the metal ion titration data of the 3'F-apt-T probe reported in Figure S1.

## SUPPORTING INFORMATION

**B.b. Implication of the metal ion binding-based electrostatic changes in the FA increase of 3'F-apt-T**

In light of the anisotropy data reported in Figure 2a, it might be suspected as a first impression that the metal ion binding to DNA directly affects the global diffusion rate of the 3'F-apt-T tracer by changing its apparent mass and conformation. However, these events should contribute to a quite limited fraction of the total FA increase. Indeed, given that the experimental divalent metal ion:base stoichiometry for random single strands does not exceed 1:2 at metal ion saturation under low background ionic strength conditions,<sup>[S22]</sup> the effective molecular mass is predicted to vary only from ~7800 Da (in the free state) to ~10300 Da (in the metal ion-complexed state) in the most extreme case study of the heaviest element binding. Furthermore, many previous works have shown that alterations in the whole DNA shape have little influence on the overall anisotropy as compared to that of the associated local perturbations.<sup>[S3,S6,S18]</sup>

With this in mind, we aimed at evaluating the contribution of metal ion binding-induced local rotation changes to the anisotropy increase of 3'F-apt-T. First, we designed a set of DNA oligonucleotides derived from apt-T, which shared a common 13-base region at the 3' end while differing by their total sequence length (from 13-mer to 63-mer SBA, Table S1). The resulting oligonucleotides were 3' end-labelled by fluorescein and titrated with increasing concentrations of  $\text{Pb}^{2+}$  or  $\text{Cd}^{2+}$  used as illustrative metal ions (Figure S3). As expected for a fluorescein motion primarily uncoupled from the whole DNA rotation, the FA signal was almost insensitive to the size of the probes in the absence of post-transition/transition metal ions.<sup>[S23]</sup> At the same time, the anisotropy of fully metal-complexed probes exhibited a significant increase with the sequence length increasing (Figure S3), consistent with the occurrence of a rotational coupling phenomenon between the dye and the DNA upon metal ion binding.<sup>[S23]</sup>

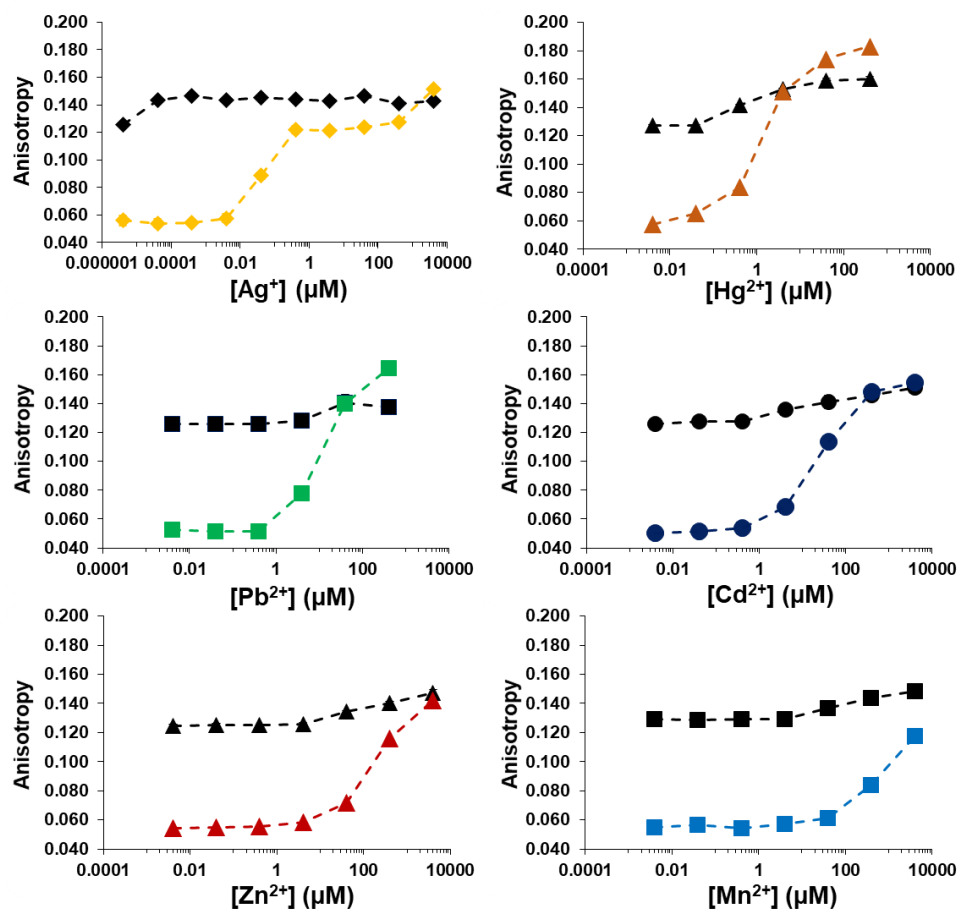


**Figure S3.** Fluorescence anisotropy of various DNA probes (3'F-SBA listed in Table S1) as a function of their sequence length, either in free form ( $r_{\text{free}}$ ) or fully complexed to  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  ( $r_{\text{metal}^{\text{max}}}$  determined from the Langmuir fitting procedure). MES buffer concentration = 50 mM. Error bars, representing the standard deviation from at least three independent experiments, are within the experimental points.

Next, we conducted post-transition/transition element titration experiments with the Texas-Red-conjugated L-Tym aptamer (3'TR-apt-T, Figure S4). In contrast to fluorescein, Texas-Red is an electrically neutral fluorophore that already engages close interactions with free state DNA, as exemplified by the high  $r_{\text{free}}$  value of 3'TR-apt-T equal to  $0.127 \pm 0.003$ , and is rather insensitive to environmental changes.<sup>[S24]</sup> Hence, if the mechanism of fluorescein-DNA motional coupling is mainly based on the metal ion-mediated neutralization of DNA charges, the replacement of the fluorescein conjugate by the Texas-Red one should lead to a much smaller response (if any). In accordance with the prediction, the FA change of 3'TR-apt-T was found to be very substantially lowered relative to that of 3'F-apt-T, lying between +0.015 and +0.035 over the concentration range of all the tested metal ions (Figure S4).

Besides the electrostatics-dependent component, we cannot exclude that local variations in the 3'-end region structure also participate to the rotational coupling process.<sup>[S3,S6,S18]</sup> For instance, constraints in the extremity dynamics triggered by the formation of intra-strand metal ion bridges<sup>[S25,S26]</sup> or supplementary contacts of the dye with nucleobases newly exposed by the unpairing/unstacking effects of metal ions<sup>[S27]</sup> could be possible sources of further dye mobility confinement.

## SUPPORTING INFORMATION



**Figure S4.** Fluorescence anisotropy of the 3'F-apt-T (black symbols) probe as a function of the post-transition/transition metal ion concentration. MES buffer concentration = 50 mM. Error bars, representing the standard deviation from at least three independent experiments, are within the experimental points. By way of comparison, the plot of 3'F-apt-T anisotropy against post-transition/transition metal ion concentration is also depicted (colored symbols).

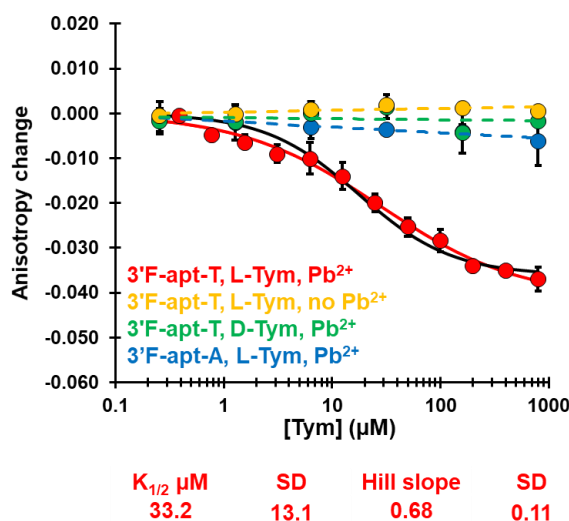


## SUPPORTING INFORMATION

B.c. Pb<sup>2+</sup>-regulated aptaswitch (50 mM MES buffer)

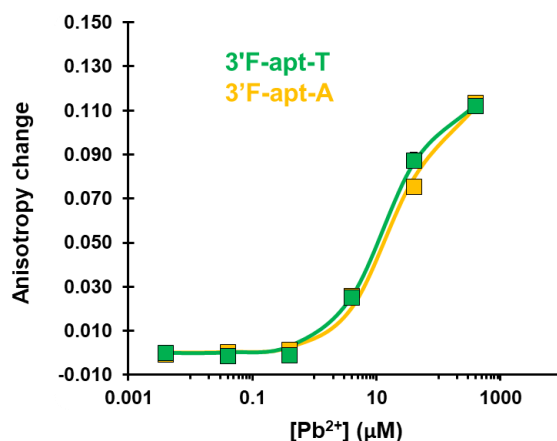
## B.c.1. Dose-response curves, specificity analysis and comparison with the direct signalling format

Figure S5 shows the L-Tym titration curve obtained with the 3'F-apt-T aptaswitch (50 mM MES buffer challenged with 40  $\mu\text{M}$  Pb<sup>2+</sup>). The estimated  $K_{1/2}$  value is comparable to the apparent dissociation constant of 12  $\mu\text{M}$  independently measured for the L-Tym-apt-T complex in Mg<sup>2+</sup>-free medium,<sup>[S1]</sup> indicating that the molecular recognition of the L-Tym-binding DNA is roughly preserved. The steepness of the semi-log scale binding curve was evaluated by the Hill slope, which was lower than the unity value characterizing a typical single-site binding. It was associated with an extended dynamic range relative to the reference one (Figure S5).



**Figure S5.** Anisotropy change of DNA probes as a function of Tym (L- or D-enantiomer) concentration ( $r_{\text{Tym}} - r_{\text{free}}$  in the absence of Pb<sup>2+</sup> or  $r_{\text{metal-Tym}} - r_{\text{metal}}$  in the presence of 40  $\mu\text{M}$  Pb<sup>2+</sup>). MES buffer concentration = 50 mM. The red curve was created by fitting the Hill model to experimental data while the black curve was derived from the Hill equation fitting with a fixed Hill slope value of 1. Error bars represent the standard deviation from at least three independent experiments.

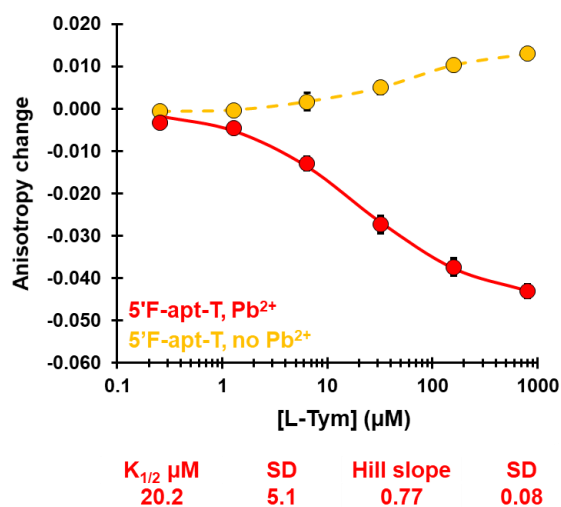
The specificity of the aptaswitch was assessed by using the non-cognate opposite enantiomer (D-Tym)<sup>[S6,S28]</sup> and the non-binding 3'F-apt-A sequence (Table S1). It was shown that 3'F-apt-A is a relevant control probe as its overall response to Pb<sup>2+</sup> exposure is similar to that of 3' F-apt-T (Figure S6). As depicted in Figure S5, we recorded a minimal anisotropy variation with either 3' F-apt-T in the presence of D-Tym or when the 3' F-apt-A was used instead of 3' F-apt-T.



**Figure S6.** Anisotropy change of 3' F-apt-T and 3'F-apt-A probes as a function of Pb<sup>2+</sup> concentration ( $r_{\text{metal}} - r_{\text{free}}$ ). MES buffer concentration = 50 mM. The curves were created by fitting the Langmuir model to experimental data. Error bars represent the standard deviation from at least three independent experiments.

We also reported that the 5' end-tagged DNA probe (5'F-apt-T) exhibits FA output, apparent binding affinity and Hill slope similar to those reported with the 3'F-apt-T probe (Figure S7 vs Figure S5). This indicates that the aptaswitch is responsive whatever the 3' or 5'-end tagging position.

## SUPPORTING INFORMATION



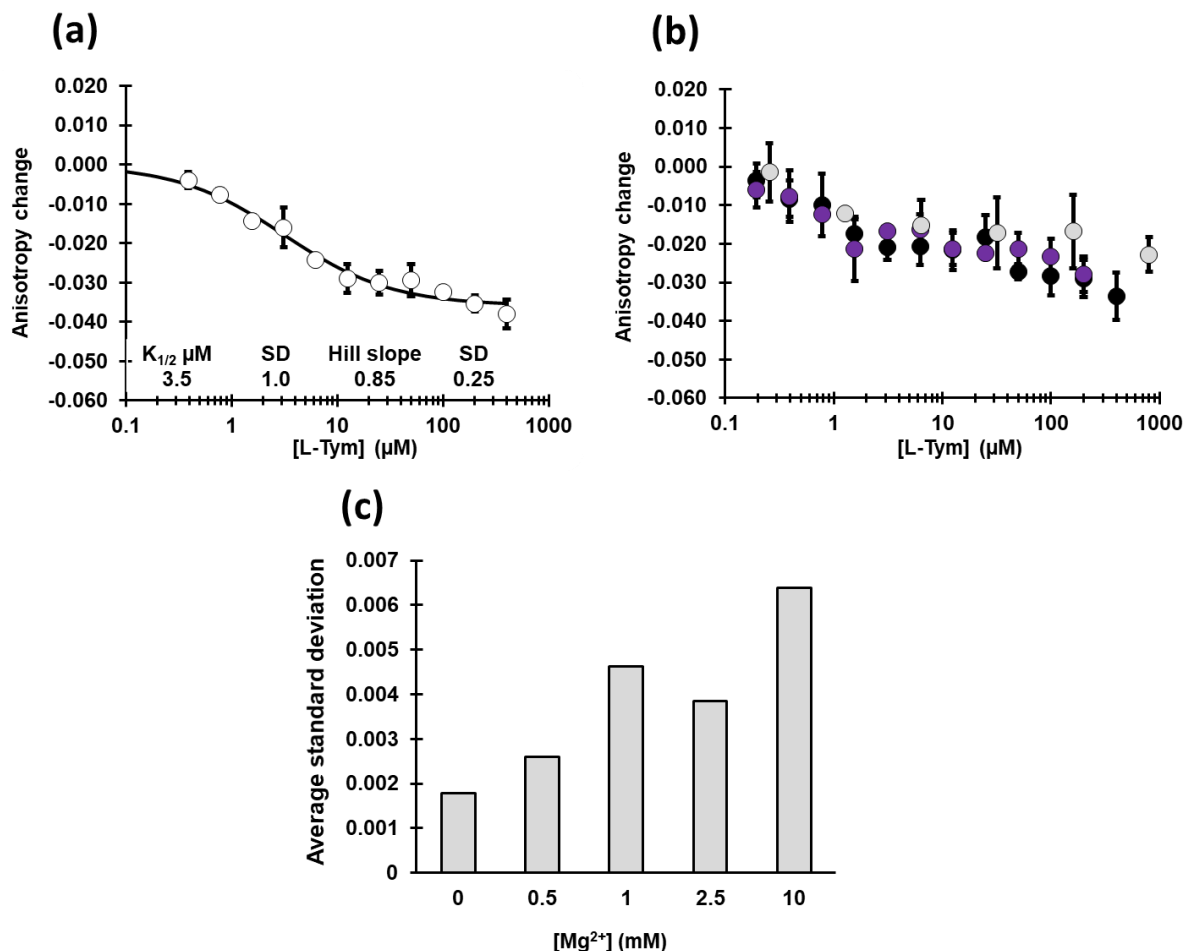
**Figure S7.** Anisotropy change of the 5'F-apt-T probe as a function of L-Tym concentration ( $r_{\text{Tym}} - r_{\text{free}}$  in the absence of  $\text{Pb}^{2+}$  or  $r_{\text{metal-Tym}} - r_{\text{metal}}$  in the presence of  $40 \mu\text{M Pb}^{2+}$ ). MES buffer concentration = 50 mM. The red curve was created by fitting the Hill model to experimental data. Error bars represent the standard deviation from at least three independent experiments.

By way of comparison, both 3'F-apt-T and 5'F-apt-T were implemented under a direct sensing format, *i. e.* without  $\text{Pb}^{2+}$  in the reaction solution. In accordance with previous results (Table S2),<sup>[S1]</sup> the tracers experienced much lower anisotropy changes over the target concentration range (Figure S5 and S7), revealing the advantages of the metal-regulated switch strategy over the direct signalling approach.

## SUPPORTING INFORMATION

B.c.2.  $Mg^{2+}$  effects on the responsivity of 3'F-apt-T

As shown in Figure S8a, the presence of  $Mg^{2+}$  at a low 0.5 mM concentration led to a clear shift of the calibration curve towards lower L-Tym concentration ( $K_{1/2} = 3.5 \mu\text{M}$  vs  $33 \mu\text{M}$  in the absence of  $Mg^{2+}$ , Figure S5), without significant impact on the absolute signal gain. However, the addition of higher  $Mg^{2+}$  amounts (1 and 2.5 mM) deteriorated both the assay precision and the curve sigmoidal pattern so that we were unable to reliably fit the Hill model to corresponding data (Figure S8b,c). Moreover, further increase in  $[Mg^{2+}]$  (10 mM) resulted in a FA response of smaller amplitude and increased variability (Figure S8b,c).



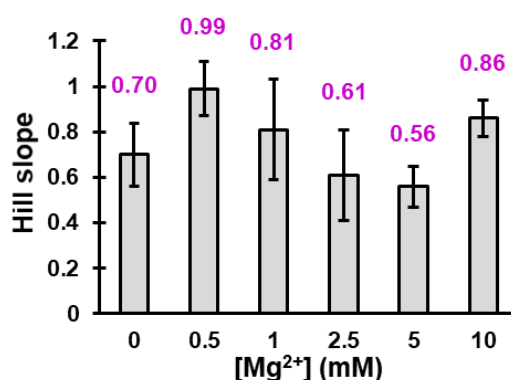
**Figure S8.** Anisotropy change ( $r_{\text{metal-Tym}} - r_{\text{metal}}$ ) of 3'F-apt-T as a function of L-Tym concentration in the presence of different  $Mg^{2+}$  concentrations. 50 mM MES buffer challenged with  $40 \mu\text{M}$  of  $Pb^{2+}$ . **(a)** 0.5 mM  $Mg^{2+}$  (open symbols). The binding parameters were extracted from the Hill model fitting procedure. Error bars represent the standard deviation from at least three independent experiments. **(b)** 1 (black symbols), 2.5 (purple symbols) and 10 (grey symbols) mM  $Mg^{2+}$ . Error bars represent the standard deviation from at least three independent experiments. **(c)** Average SD from all curve experimental data as a function of the  $Mg^{2+}$  concentration.

## SUPPORTING INFORMATION

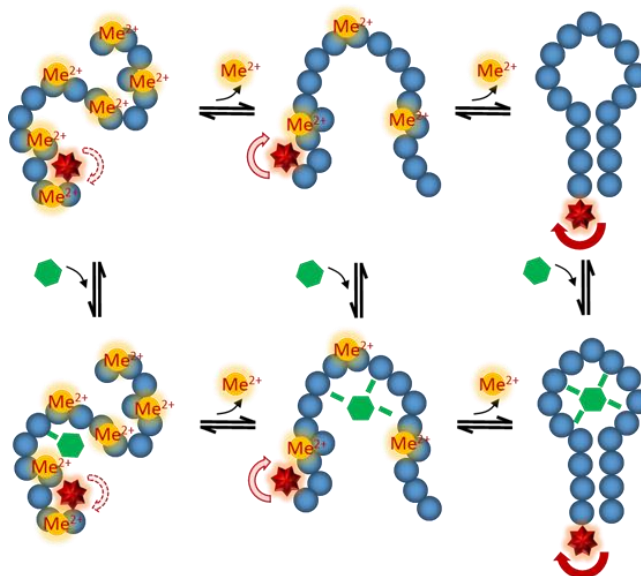
## B.d. L-Tym-induced activation process of the aptaswitch

In the absence of  $Mg^{2+}$ , a weak steepness (Hill slope  $< 1$ ) and a large dynamic range characterized the dose-response curves (for MES buffer concentration of 10 and 50 mM, Figures 3, S5, S7, S9). As apt-T contains only one binding site for L-Tym,<sup>[S1]</sup> this phenomenon cannot be interpreted as a negatively cooperative binding between the target and the aptamer. The broad-range response rather suggests the existence of a heterogeneous switching/reporting regime.<sup>[S8,S29,S30]</sup> Depending on their localization along the DNA strand and the diversity of their coordination preference and binding affinity,<sup>[S26]</sup> the bound  $Pb^{2+}$  ions are expected to perturb the molecular recognition structure as well as the anisotropy signal of probes in a very disparate manner. As such, the conversion from the inert metal ion-complexed form to the optimally responsive L-Tym-bound conformer likely follows a multistage pathway with intermediate states of graded activation levels.<sup>[S29]</sup> For illustrative purposes, a schematic model is proposed in Figure S10.

Changes in the  $Mg^{2+}$  concentration engendered large fluctuations in the overall shape of dose-response curves (for MES buffer concentration of 10 and 50 mM, Figures 3, S8, S9). One interpretation of this is that, besides its stabilizing effects on the competent conformation,<sup>[S1]</sup> the alkaline earth metal ion can also directly compete with  $Pb^{2+}$  for particular apt-T sites.<sup>[S31]</sup> Taken together, these features would lead to intricate  $[Mg^{2+}]$ -dependent rearrangements in the local density, binding and spatial distribution of the  $Pb^{2+}$  inhibitor, and consequently in the overall signalling route of the aptaswitch.



**Figure S9.**  $Mg^{2+}$  concentration dependence of Hill slope. The Hill slope values were determined from the anisotropy change of 3'F-apt-T as a function of L-Tym concentration (Figure 3) in the presence of various  $Mg^{2+}$  concentrations. 10 mM MES buffer challenged with 40  $\mu M$  of  $Pb^{2+}$ .



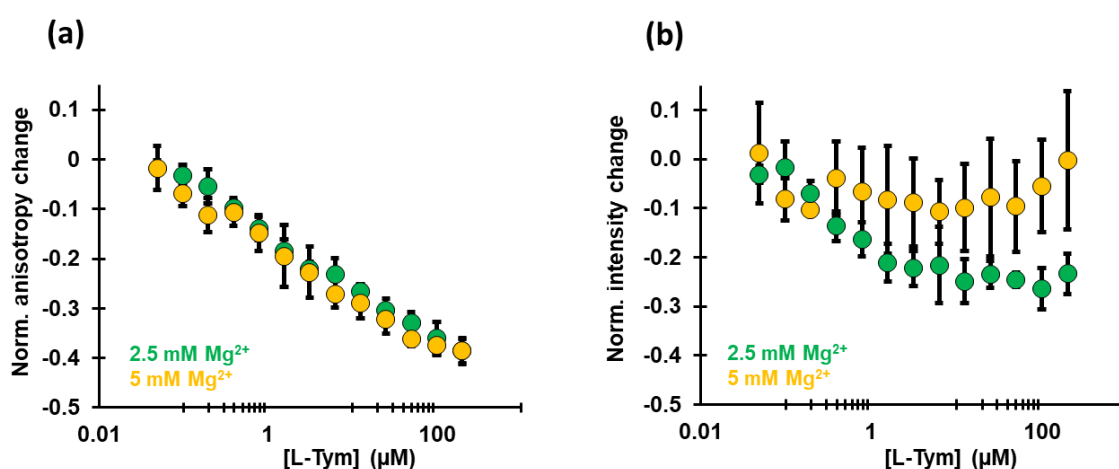
**Figure S10.** Proposed model of multistage pathway with gradually activated intermediate states, as described by an extended linkage scheme of conformational selection (top) and induced fit (bottom) binding mechanisms.<sup>[S32]</sup>

## SUPPORTING INFORMATION

B.e. Analytical features of the  $\text{Pb}^{2+}$ -regulated 3'F-apt-T aptaswitch (10 mM MES)

The L-Tym calibration curves, shown in Figure S11a for the 2.5 mM and 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations (3'F-apt-T probe, 10 mM MES challenged with 40  $\mu\text{M}$  of  $\text{Pb}^{2+}$ ), were constructed by plotting the normalized anisotropy change against the target concentration. The 3'F-apt-T aptaswitch afforded a limit of detection (LOD, based on a signal-to-noise ratio > 3) varying from 200 (at 2.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ) to 400 nM (at 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ). In accordance with the weak Hill slope values (Figure S9), the dynamic ranges experimentally spanned 1000-to-2000-fold change in L-Tym concentration. As summarized in Table S3, these analytical parameters favourably compare with those of a variety of earlier aptasensors devoted to the L-Tym quantitation. One previous aptamer-based tool has achieved a lower LOD but with a narrower dynamic range and a more complicated sensing design.<sup>[S7]</sup>

For guidance purposes, we compared in the same conditions the normalized anisotropy output with that relying on total emission intensity measurements (Figure S11b). In the absence of target, the addition of 40  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$  to the 10 mM MES buffered solution led to a small increase in the fluorescence intensity of the 3'F-apt-T probe (data not shown). As such, we found a negligible or limited decrease in the normalized intensity signal over the L-Tym concentration range. In addition, the overall variability was much higher than that reported in anisotropy (Figure S11b vs Figure S11a). These findings clearly demonstrate the superiority of the FA readout mode for monitoring the present switching process.



**Figure S11.** Normalized changes in (a) anisotropy ( $(r_{\text{metal-Tym}} - r_{\text{metal}})/r_{\text{metal}}$ ) and (b) total emission intensity ( $(I_{\text{L-metal-Tym}} - I_{\text{L-metal}})/I_{\text{L-metal}}$ ) of 3'F-apt-T as a function of the L-Tym concentration in the presence of 2.5 or 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . 10 mM MES buffer challenged with 40  $\mu\text{M}$  of  $\text{Pb}^{2+}$ . Error bars represent the standard deviation from at least three independent experiments.

**Table S3.** Analytical parameters of various L-Tym aptasensors.

Strategy	LOD ( $\mu\text{M}$ )	Dynamic range	Reference
Metal-regulated FA sensor (end-labelled 23-mer)	0.2-0.4	Extended (1000-to-2000-fold change)	this work
Intercalator displacement-based FA sensor (unmodified 23-mer)	15-20	Extended (~1000-fold change)	[S33]
Competition-based electrochemical sensor (unmodified 23-mer)	~5	Typical***	[S1]
CS*-based FI sensor (end-labelled 28-mer)	~5-10	Typical	[S34]
CS-based FA sensor (unmodified 38-mer)	0.25	Typical	[S35]
CS-based FI sensor (end-labelled 38-mer)	~5-10	Not determinable	[S28]
Enzymatic digestion protection-based colorimetry sensor (unmodified 38-mer)	5	Typical	[S36]
Direct FA sensor (end-labelled 49-mer)	0.2	Typical	[S6]
Direct BLI** sensor (surface-attached 49-mer)	2-15	Typical	[S37]
CS-based FA sensor (end-labelled 49-mer)	0.04	Typical	[S7]
Enzymatic digestion protection-based FA sensor (end-labelled 49-mer)	15	Typical	[S38]

\* CS: complementary strand

\*\* BLI: Bio-Layer Interferometry

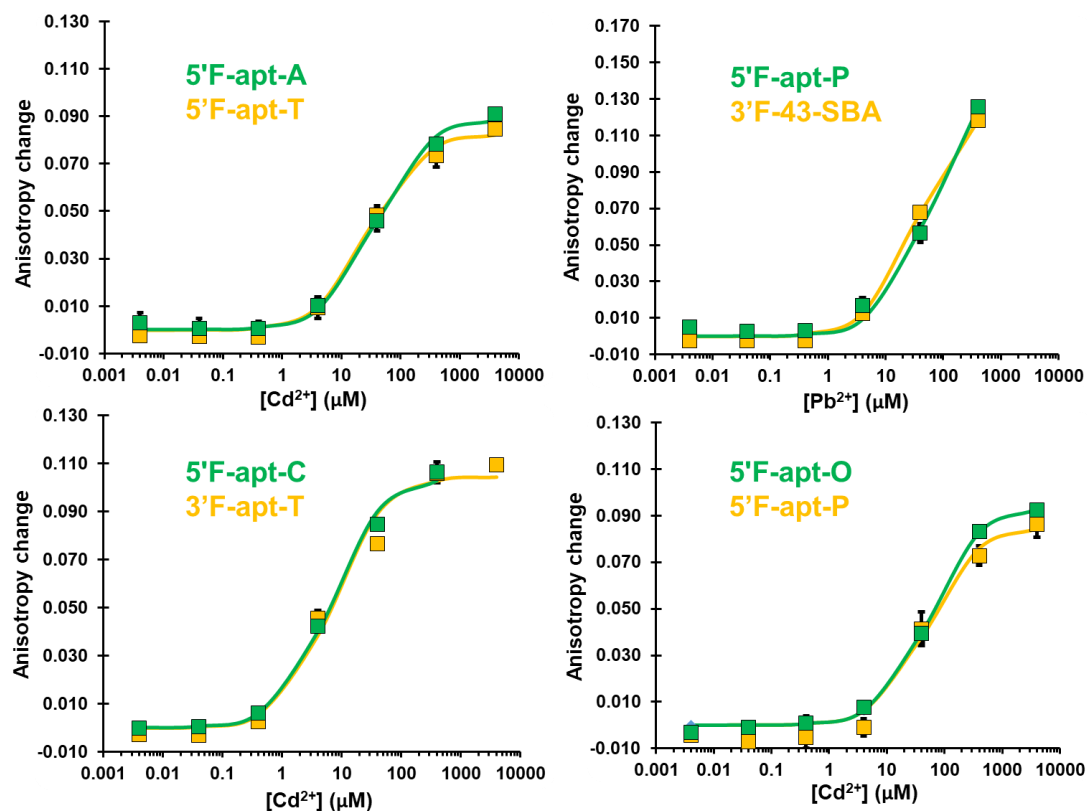
\*\*\* Typical dynamic range designates a ~100-fold change in target concentration

## SUPPORTING INFORMATION

## C. Other aptaswitches

## C.a. Control probes for the specificity examination of aptaswitches

As reported for the L-Tym system, the control analysis involved non-binding DNA probes that exhibit an overall metal ion-induced response similar to that of tested aptaswitches. The metal titration curves of these selected oligonucleotide 'pairs' are presented in Figure S12. To note, upon addition of  $\text{Pb}^{2+}$ , 5'F-apt-P displayed higher  $K_d^{\text{app}}$  and maximal signal gain values than other aptamer-based tracers. In such case, we turned on the 3'F-43-SBA probe to conduct the specificity study (Figure S12).



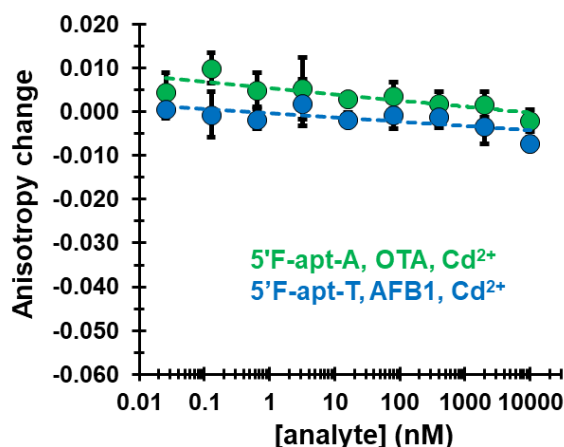
**Figure S12.** Anisotropy change of various DNA probes as a function of  $\text{Cd}^{2+}$  or  $\text{Pb}^{2+}$  concentration ( $r_{\text{metal}} - r_{\text{free}}$ ). Binding buffer: 10 mM MES for the 5'F-apt-C/3'F-apt-T 'pair' or 50 mM MES containing 0.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  for the other 'pairs'. For the titration experiments of the 5'F-apt-C probe, the  $\text{Cd}^{2+}$  concentration range was reduced to 0-400  $\mu\text{M}$  due to significant fluorescence quenching effects at 4 mM. The curves were created by fitting the Langmuir model to experimental data. Error bars represent the standard deviation from at least three independent experiments.

## SUPPORTING INFORMATION

## C.b. AFB1 aptaswitch

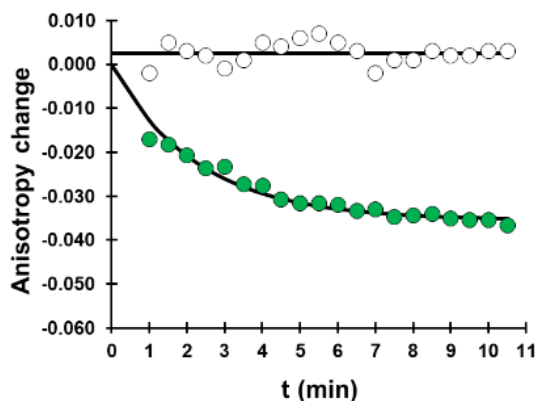
Regarding the dose-response experiments of the 5′F-apt-A aptaswitch (Figure 4), no clear signal saturation was observed. This behaviour could be ascribed to the combined effect of a broadened dynamic range as above-mentioned (Figure S10) and a limited target concentration range (see experimental section). Given that no reliable fitting was therefore attainable, the curve in Figure 4 was created by attributing arbitrary values to the Hill equation binding parameters.

As depicted in Figure S13, no significant response was recorded with the non-cognate OTA compound<sup>[S2]</sup> or the non-binding 5′F-apt-T probe (Figure S12), denoting the 5′F-apt-A aptaswitch specificity.



**Figure S13.** Anisotropy change of DNA probes as a function of AFB1 or OTA concentration ( $r_{\text{metal-analyte}} - r_{\text{metal}}$ ) in the presence of  $40 \mu\text{M Cd}^{2+}$ . Binding buffer: 50 mM MES containing  $0.5 \text{ mM Mg}^{2+}$ . For an accurate comparison, the scale of variation of anisotropy is identical to that shown in the Figure. 4. Error bars represent the standard deviation from at least three independent experiments.

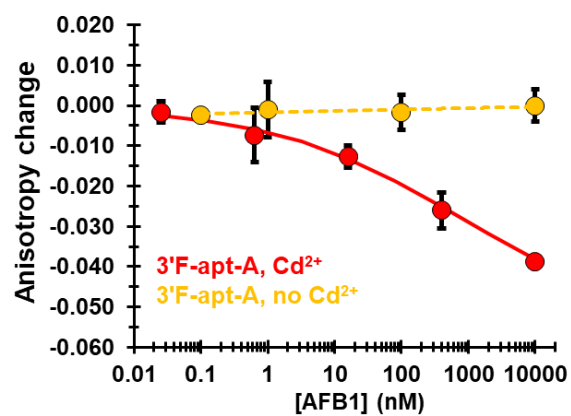
The real-time monitoring of AFB1 (Figure S14) revealed that the 5′F-apt-A switch signals the presence of target with an apparent  $t_{1/2}$  value of  $\sim 1.5$  min. In such case, the FA signal was recorded after at least 5 min of sample incubation (see experimental section).



**Figure S14.** Real-time monitoring of  $2 \mu\text{M AFB1}$  using 5′F-apt-A in the presence of  $40 \mu\text{M Cd}^{2+}$ . Binding buffer: 50 mM MES containing  $0.5 \text{ mM Mg}^{2+}$ . The FA signal was recorded at a regular time interval of 30 s after the first measurement ( $\sim 1$  min). Anisotropy change represents the  $r_{\text{metal-AFB1}} - r_{\text{metal}}$  difference. Blank experiment was conducted by introducing the buffer only instead of the target-supplemented buffer into the sample (open symbols). The curve was created by fitting the kinetic model to experimental data.

As shown in Figure S15, the 3′F-apt-A tracer, which did not respond upon exposure to AFB1 in the absence of transition metal ion, led to a target-induced FA variation similar to that of 5′F-apt-A in the  $\text{Cd}^{2+}$ -regulated scheme (Figure 4). This confirms the results reported with the L-Tym aptaswitch (Figure S5 and S7).

## SUPPORTING INFORMATION



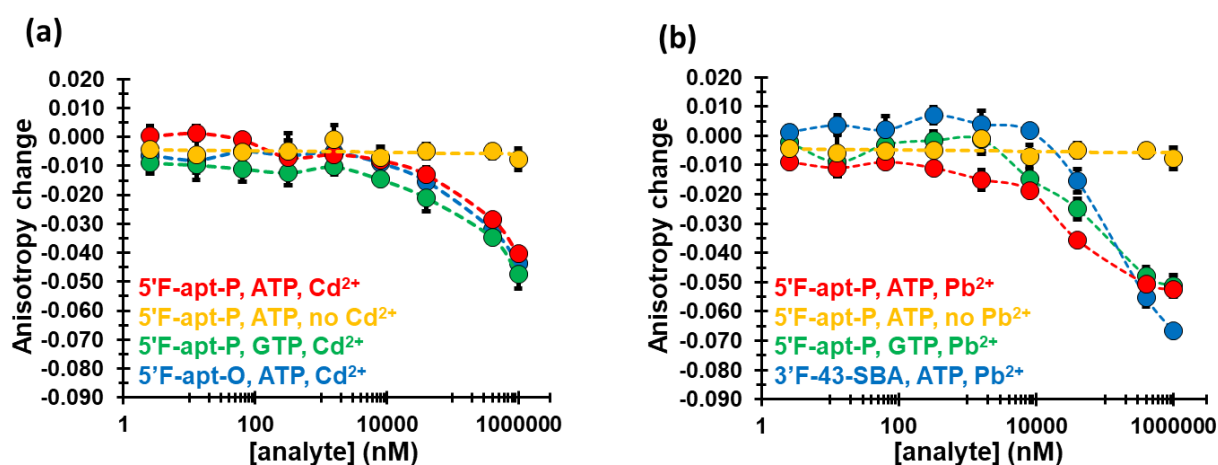
**Figure S15.** Anisotropy change of the 3'F-apt-A probe as a function of AFB1 concentration ( $r_{\text{AFB1}} - r_{\text{free}}$  in the absence of Cd<sup>2+</sup> or  $r_{\text{metal-AFB1}} - r_{\text{metal}}$  in the presence of 40  $\mu\text{M}$  Cd<sup>2+</sup>). Binding buffer: 50 mM MES containing 0.5 mM Mg<sup>2+</sup>. The red curve was created by attributing arbitrary values to the Hill equation binding parameters. Error bars represent the standard deviation from at least three independent experiments.



## SUPPORTING INFORMATION

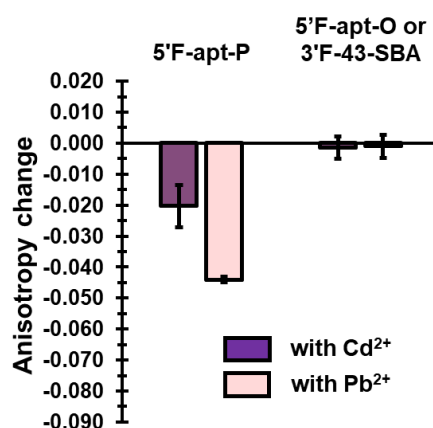
## C.c. ATP aptaswitch

While no response was obtained in direct format, the 5'-F-apt-P probe produced a significant ATP-dependent signal change in the presence of 40  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  (Figure S16a) or  $\text{Pb}^{2+}$  (Figure S16b). At 1 mM of ATP, the anisotropy of the tracer in the presence of post-transition/transition metal ions was close to that obtained in their absence, *i. e.*  $r_{\text{metal-ATP}} \sim r_{\text{ATP}}$ , suggesting the nearly complete inhibition of the metal ion binding to DNA upon exposure to high concentrations of target. However, we recorded a similar FA variation with the non-binding tracers (5'-F-apt-O or 3'-F-43-SBA, Figure S12) or when the non-cognate GTP nucleotide<sup>[S11]</sup> was used instead of ATP (Figure S16). These results clearly indicate that the generated signal is independent on the molecular recognition of apt-P.



**Figure S16.** Anisotropy change of DNA probes as a function of ATP or GTP concentration ( $r_{\text{analyte}} - r_{\text{free}}$  in the absence of  $\text{Me}^{2+}$  or  $r_{\text{metal-analyte}} - r_{\text{metal}}$  in the presence of 40  $\mu\text{M}$   $\text{Me}^{2+}$ ) using (a)  $\text{Cd}^{2+}$  and (b)  $\text{Pb}^{2+}$  metal ions. Binding buffer: 50 mM MES containing 0.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . Error bars represent the standard deviation from at least three independent experiments.

Given the well-known ability of nucleotides to form very stable complexes with the divalent metal ions,<sup>[S39]</sup> one can suppose that the anisotropy decrease is based on the competitive trapping of metal cations by free ATP. To go further, we then tested adenosine (Ade) instead of ATP, at the highest concentration in the range (1 mM). Ade is known to be recognised by apt-P with an affinity similar to that of ATP,<sup>[S3,S11]</sup> but it binds much more weakly to divalent metal ions.<sup>[S26]</sup> Just like ATP, Ade did not induce any significant response for 5'-F-apt-P in direct format (data not shown). In contrast to what was observed with ATP, no anisotropy change was recorded with the nucleoside using the control probes (5'-F-apt-O or 3'-F-43-SBA) in the presence of  $\text{Cd}^{2+}$  or  $\text{Pb}^{2+}$  (Figure S17). At the same time, 5'-F-apt-P produced a signal output when exposed to Ade (especially with the  $\text{Pb}^{2+}$  metal ion), indicating that, for this analyte, apt-P can be converted into a specific aptaswitch. These data support that the ATP-dependent FA changes shown in Figure S16 are related to the strong binding of the switching metal ions to the nucleotide.



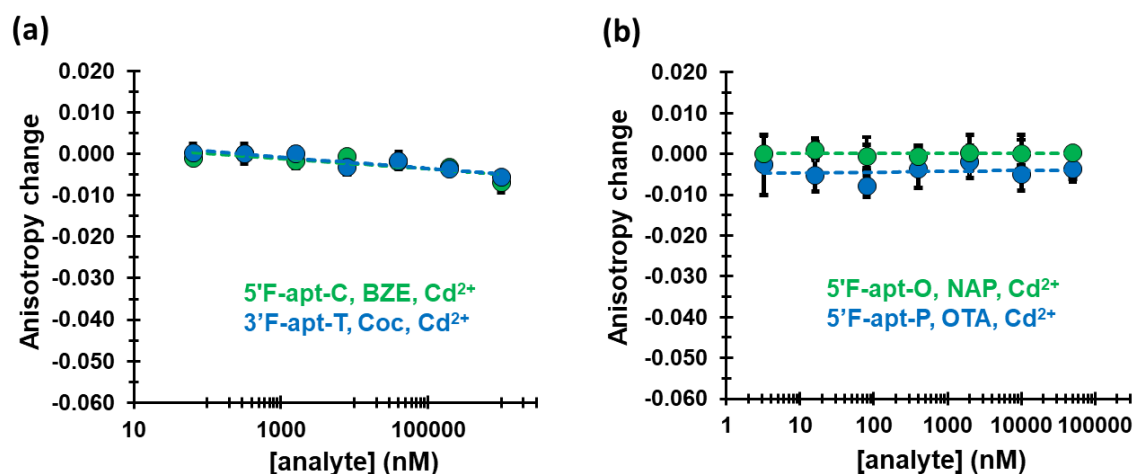
**Figure S17.** Anisotropy change of DNA probes challenged with 1 mM Ade ( $r_{\text{metal-Ade}} - r_{\text{metal}}$  in the presence of 40  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  or  $\text{Pb}^{2+}$ ). Binding buffer: 50 mM MES containing 0.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . Error bars represent the standard deviation from at least three independent experiments.

## SUPPORTING INFORMATION

## C.d. Coc and OTA aptaswitches

When compared with the other aptaswitches, the  $\text{Cd}^{2+}$ -controlled 5'F-apt-C and 5'F-apt-O probes displayed lower FA variations upon addition of their respective targets (Figure 4). It could be hypothesised that the slightly longer sequence of apt-C and apt-O (Table S1) increases the likelihood of encountering regions of DNA that are not highly reactive to the target binding, which would make the metal ions less easy to move. Further work would be needed to clearly identify the reasons for these outputs.

No significant signal change appeared when the targets or aptamers were replaced by non-cognate analytes (BZE<sup>[S12]</sup> or NAP<sup>[S13]</sup>) or control oligonucleotides (3'F-apt-T or 5'F-apt-P, Figure S12), respectively (Figure S18). This demonstrates the specificity of both aptaswitches.



**Figure S18.** (a) Anisotropy change of DNA probes as a function of Coc or BZE concentration ( $r_{\text{metal-analyte}} - r_{\text{metal}}$ ) in the presence of  $40 \mu\text{M Cd}^{2+}$ . Binding buffer: 10 mM MES. (b) Anisotropy change of DNA probes as a function of OTA or NAP concentration ( $r_{\text{metal-analyte}} - r_{\text{metal}}$ ) in the presence of  $40 \mu\text{M Cd}^{2+}$ . Binding buffer: 50 mM MES containing  $0.5 \text{ mM Mg}^{2+}$ . For an accurate comparison, the scale of variation of anisotropy is identical to that shown in the Figure. 4. Error bars represent the standard deviation from at least three independent experiments.

## SUPPORTING INFORMATION

## D. Overview of the apparent affinities for aptaswitches

Table S4 lists the  $K_{1/2}$  values estimated from the dose-response curve fitting procedure for the L-Tym, AFB1, Coc and OTA aptaswitches. These were compared with the literature  $K_d$  data of the corresponding target-aptamer complexes (Table S4). Although the values are of the same order of magnitude, the general trend is that the apparent affinity of the aptaswitches appears somewhat diminished compared to that of the aptamers. This is consistent with a typical molecular switch for which its binding affinity is lessened when the inactive state is promoted by the addition of switching elements.<sup>[S40]</sup>

**Table S4.** Estimated  $K_{1/2}$  vs literature  $K_d$  for different systems.

System	$K_{1/2}^*$	Literature $K_d$
L-Tym (no $Mg^{2+}$ )	20-70 $\mu M^{**}$	12 $\mu M^{[S1]}$
L-Tym (10 mM $Mg^{2+}$ )	0.8 $\mu M$	0.8 $\mu M^{[S1]}$
AFB1	Not determinable****	50 nM <sup>[S2]</sup>
Coc	60 $\mu M^{****}$	15-50 $\mu M^{[S17,S41]}$
OTA	2 $\mu M^{****}$	0.1-1 $\mu M^{[S5,S42,S43]}$

\* %RSD of  $K_{1/2}$  is typically in the 15-50% range.

\*\* The  $K_{1/2}$  values varied as a function of the MES buffer concentration (10 or 50 mM), most likely due to  $Pb^{2+}$ -induced changes in the population of the inactive state (see the main text).

\*\*\* No reliable fitting was possible for the dose-response curves of AFB1 (see the 'C. b. AFB1 aptaswitch' part of the Supporting Information).

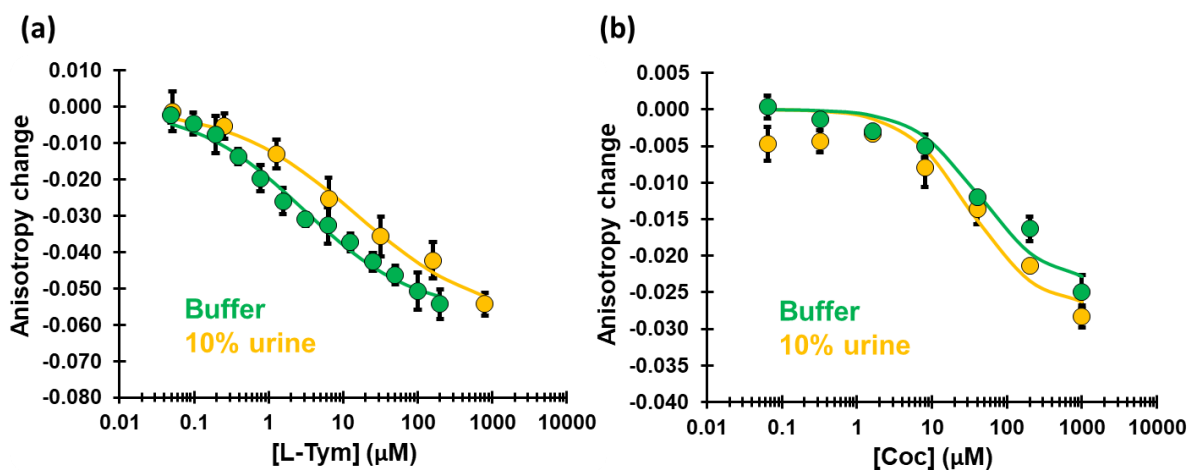
\*\*\*\* Given the limited number of experimental points in the response range of the assay (Figure 4), the fit of the Hill model to the data was only conducted by setting the Hill slope to 1.

## SUPPORTING INFORMATION

## E. Study of the aptaswitch functionality in realistic samples

To assess the aptaswitch activity in real-life conditions, we carried out dose-response experiments using diluted urine samples spiked with the L-Tym or Coc model analytes. This biological fluid is a particularly challenging matrix since it produces background fluorescence and contains interfering components as well as variable amounts of metal ions.<sup>[S12,S15]</sup> In addition, the presence of species such as phosphate, citrate and oxalate in significant quantities (ranging from sub-mM to mM) could, through their well-known capabilities to chelate metal ions, further complicate the sample analysis by our sensing method.

For samples containing 10 % urine, the calibration curve of the 3'F-apt-T aptaswitch was shifted slightly to the right of the reference curve. Nevertheless, the sensor was able to signal the presence of L-Tym with a similar absolute FA gain (Figure S19a). The Coc dose-response curve was comparable to that of the pure buffered solution, retaining both the apparent affinity and maximal signal change (Figure S19b). These results suggest that our aptaswitch scheme has potential for detecting analytes in diluted complex matrices. We also noted that higher proportions of urine (20%) in the samples provoke detrimental interferences that lead to a minimal FA response for the two systems (data not shown).



**Figure S19.** (a) Anisotropy change ( $r_{\text{metal-Tym}} - r_{\text{metal}}$ ) of 3'F-apt-T as a function of the L-Tym concentration for samples in either 10 mM MES buffer or 10 mM MES buffer containing 10% urine, in the presence of 2.5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  and 40  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}^{2+}$ . (b) Anisotropy change ( $r_{\text{metal-Coc}} - r_{\text{metal}}$ ) of 5'F-apt-C as a function of the Coc concentration for samples in either 10 mM MES buffer or 10 mM MES buffer containing 10% urine, in the presence of 40  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ . Error bars represent the standard deviation from at least three independent experiments.

## SUPPORTING INFORMATION

## References

- [S1] L. Challier, R. Miranda-Castro, B. Barbe, C. Fave, B. Limoges, E. Peyrin, C. Ravelet, E. Fiore, P. Labbé, L. Coche-Guérente, E. Ennifar, G. Bec, P. Dumas, F. Mavré, V. Noël, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 11963-11971.
- [S2] L. Sun, Q. Zhao, *Talanta* **2018**, *189*, 442-450.
- [S3] S. Perrier, C. Ravelet, V. Guieu, J. Fize, B. Roy, C. Perigaud, E. Peyrin, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1652-1657.
- [S4] M. N. Stojanovic P. de Prada, D. W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4928-4931.
- [S5] K. L. Kadok, R. A. Manderville, *ACS Omega* **2017**, *2*, 4955-4963.
- [S6] J. Ruta, S. Perrier, C. Ravelet, J. Fize, E. Peyrin, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7468-7473.
- [S7] S. Perrier, P. Bouilloud, G. De Oliveira Coelho, M. Henry, E. Peyrin, *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *82*, 155-161.
- [S8] S. V. Solomatin, M. Greenfeld, D. Herschlag, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 732-734.
- [S9] S. Perrier, V. Guieu, B. Chovelon, C. Ravelet, E. Peyrin, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 4236-4248.
- [S10] H. Arakawa, J. F. Neault, H. A. Tajmir-Riahi, *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1580-1587.
- [S11] R. Nutiu, Y. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4771-4778.
- [S12] A. Sachan, M. Ilgu, A. Kempema, G. A. Kraus, M. Nilsen Hamilton, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 7715-7723.
- [S13] J. A. Cruz-Aguado, G. Penner, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8853-8855.
- [S14] S. D. Jhaveri, R. Kirby, R. Conrad, E. J. Maglott, M. Bowser, R. T. Kennedy, G. Glick, A. D. Ellington, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2469-2473.
- [S15] E. J. Merino, K. M. Weeks, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12766-12767.
- [S16] Q. Zhao, Q. Lv, H. Wang, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *70*, 188-193.
- [S17] Y. Liu, Q. Zhao, *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 3993-4000.
- [S18] Q. Zhao, Q. Lv, H. Wang, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 1238-1245.
- [S19] B. C. Galarreta, M. Tabatabaei, V. Guieu, E. Peyrin, F. Lagugné-Labarthe, *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 1613-1621.
- [S20] Y. Liu, Q. Zhao, *Anal. Methods*, **2016**, *8*, 2383-2390.
- [S21] L. Liu, Q. Zhao, *J. Environ. Sci.*, **2020**, *97*, 19-24.
- [S22] J. G. Holland, D. S. Jordan, F. M. Geiger, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 8338-8345.
- [S23] M. Zou, Y. Chen, X. Xu, H. Huang, N. Li, *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *32*, 148-154.
- [S24] J. R. Unruh, G. Gokulrangan, G. H. Lushington, C. K. Johnson, G. S. Wilson, *Biophys. J.* **2005**, *88*, 3455-3465.
- [S25] D. A. Sorokin, V. A. Valeev, G. O. Gladchenko, M. V. Degtiar, Y. P. Blagoi, *Macromol. Biosci.* **2001**, *1*, 191-203.
- [S26] R. K. O. Sigel, H. Sigel, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 974-984.
- [S27] J. Duguid, V. A. Bloomfield, J. Benevides, G. J. Thomas Jr, *Biophys. J.* **1993**, *65*, 1916-1928.
- [S28] T. A. Feagin, D. P. V. Olsen, Z. C. Headman, J. Heemstra, M. J. Am. Chem. Soc. **2015**, *137*, 4198-4206.
- [S29] C. K. Kwok, M. E. Sherlock, P. C. Bevilacqua, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 711-714; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 683-686.
- [S30] S. Munshi, S. Gopi, S. Subramanian, L. A. Campos, A. N. Naganathan, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 4044-4053.
- [S31] A. Dallas, A. V. Vlassov, S. A. Kazakov in *Principles of nucleic acid cleavage by metal ions* (Ed.: M. A. Zenkova), Nucleic Acids and Molecular Biology, Vol. 13; Springer-Verlag, **2004**.
- [S32] A. D. Vogt, N. Pozzi, Z. Chen, E. Di Cera, *Biophys. Chem.* **2014**, *186*, 13-21.
- [S33] B. Chovelon, E. Fiore, P. Faure, E. Peyrin, C. Ravelet, *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *90*, 140-145.
- [S34] Z. Tan, T. A. Feagin, J. M. Heemstra, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 6328-6331.
- [S35] Z. Zhu, T. Schmidt, M. Mahrous, V. Guieu, S. Perrier, C. Ravelet, E. Peyrin, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *707*, 191-196.
- [S36] V. Guieu, C. Ravelet, S. Perrier, Z. Zhu, S. Cayez, E. Peyrin, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *706*, 349-353.
- [S37] A. Vignon, A. Flaget, M. Michelas, M. Djeghdir, E. Defranco, L. Coche-Guerente, N. Spinelli, A. Van der Heyden, J. Dejeu, *ACS Sens.* **2020**, *5*, 2326-2330.
- [S38] A. Kidd, V. Guieu, S. Perrier, C. Ravelet, E. Peyrin, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 3229-3234.
- [S39] A. Kazakov, S. M. Hecht, Nucleic Acid-Metal Ion Interactions in *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, **2011**.
- [S40] A. Vallée-Bélisle, F. Ricci, K. W. Plaxco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13802-13807.
- [S41] M. A. D. Neves, A. A. Shoara, O. Reinstein, O. A. Borhani, T. R. Martin, P. E. Johnson, *ACS Sens.* **2017**, *2*, 1539-1545.
- [S42] J. A. Cruz-Aguado, G. Penner, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10456-10461.
- [S43] P. S. Deore, M. D. Gray, A. J. Chung, R. A. Manderville, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 14288-14297.

## Author Contributions

The contribution of each author is as follows: B. Billet, B. Chovelon, E. Fiore, F. Oukacine and M-A Petrillo carried out the experiments and analyzed the data, P. Faure, C. Ravelet and E. Peyrin designed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript.

## Discussion et conclusion

À l'issue de l'étape de screening, l'ion  $Pb^{2+}$  a été sélectionné pour les expérimentations ultérieures, impliquant la réalisation de courbes dose-réponse. Par la suite, nous avons entrepris d'optimiser les performances du capteur en ajustant certaines conditions opératoires, notamment la concentration en  $Mg^{2+}$  et la force ionique, dans le but d'améliorer l'affinité apparente tout en conservant une amplitude de signal significative. Nous avons supposé que l'ajout de  $Mg^{2+}$  renforcerait la liaison aptamère-cible, tandis que la réduction de la concentration en  $Na^+$  dans le tampon faciliterait l'accès des ions  $Pb^{2+}$  à l'ADN, par diminution du bouclier électrostatique. Ces hypothèses ont été confirmées expérimentalement, et un compromis a été obtenu pour des concentrations en  $Mg^{2+}$  et  $Na^+$  de 2,5 mM et 6 mM respectivement. Nous avons calculé une limite de détection égale à 200 nmol/L, valeur comparable à celle d'autres aptacapteurs dédiés à la quantification de la L-tyrosinamide. Des tests de spécificité avec un autre aptamère et avec la D-tyrosinamide ont été effectués avec succès. En outre, des expériences en format direct, sans introduction d'ions métalliques, ont clairement démontré que ces derniers étaient indispensables pour le fonctionnement de notre méthode.

Nous avons pu étendre notre stratégie à la détection d'autres petites molécules telles que l'aflatoxine B1 (312,27 g/mol), l'ochratoxine A (403,81 g/mol) et la cocaïne (303,35 g/mol). Ces cibles ont été choisies en raison de leur intérêt biologique, ainsi que de la diversité des structures secondaires adoptées par leurs aptamères respectifs (hairpin, G-quadruplex et « three-way junction »). Pour ces systèmes, l'ion  $Cd^{2+}$  a été sélectionné comme élément de commutation structurale.

Une réaction rapide n'excédant pas cinq minutes a été mise en évidence par des expériences de cinétique effectuées pour la détection de la L-tyrosinamide et de l'aflatoxine B1, satisfaisant ainsi l'un des critères essentiels pour un biocapteur. Un autre aspect important est l'applicabilité potentielle en milieu complexe, qui a été favorablement évaluée dans une matrice contenant 10% d'urine pour la détection de la L-tyrosinamide et de la cocaïne.

En conclusion, notre approche a abouti à la conception d'un capteur optique simple à mettre en œuvre, rapide et économique, capable de détecter plusieurs petites molécules au moyen d'aptamères présentant diverses structures secondaires. Il est toutefois important de noter que la liaison et le positionnement des ions métalliques sur les acides nucléiques s'effectuent de manière aléatoire, pouvant parfois conduire à un changement de signal modéré,

particulièrement pour des séquences d'aptamères supérieures à 30 bases. Ce phénomène pourrait être attribué à la difficulté de déplacer les ions métalliques fixés dans des régions peu sensibles à la reconnaissance de la cible. Par ailleurs, cette méthode ne convient pas pour des cibles complexant fortement les ions métalliques, comme l'ATP par exemple. Malgré ces limites, notre stratégie de transduction est novatrice et pourrait être adaptée à un dispositif point-of-care, à condition de procéder à une évaluation approfondie de ses performances analytiques, notamment dans des environnements complexes.

De par la nature électrostatique de notre méthode, la conception de plateformes électrochimiques « label-free » de type FET est envisageable. Pour la suite, nous avons néanmoins choisi de rester sur une détection optique pour le développement de nos prochaines preuves de concept.

## 2. Utilisation d'ions métalliques « quenchers » pour le développement d'un aptacapteur pour la détection de petites molécules par intensité de fluorescence.

### Contexte et stratégie :

Lors de l'étape de screening menée dans le travail précédent, nous avons également testé l'ion  $\text{Ni}^{2+}$ , qui a donné des résultats atypiques lorsqu'il a été mis en présence de l'aptamère anti-L-tyrosinamide marqué avec le Texas Red. Contrairement aux autres cations métalliques, une augmentation de l'anisotropie de fluorescence a été observée, associée à une diminution de l'intensité de fluorescence. De façon surprenante, nous avons également constaté un décalage de la courbe dose-réponse vers les plus faibles concentrations de L-tyrosinamide, se traduisant par une inversion des courbes de titrage par rapport aux autres ions métalliques testés.

Ces observations nous ont conduit à mettre en œuvre un nouveau mécanisme de transduction en se basant sur les propriétés de quenching que présentent certains ions métalliques de transition tels que  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$ . Dans ce contexte, l'anisotropie de fluorescence n'a pas été utilisée comme technique de transduction car le principe ne repose plus majoritairement sur des modifications de la mobilité intrinsèque du fluorophore.

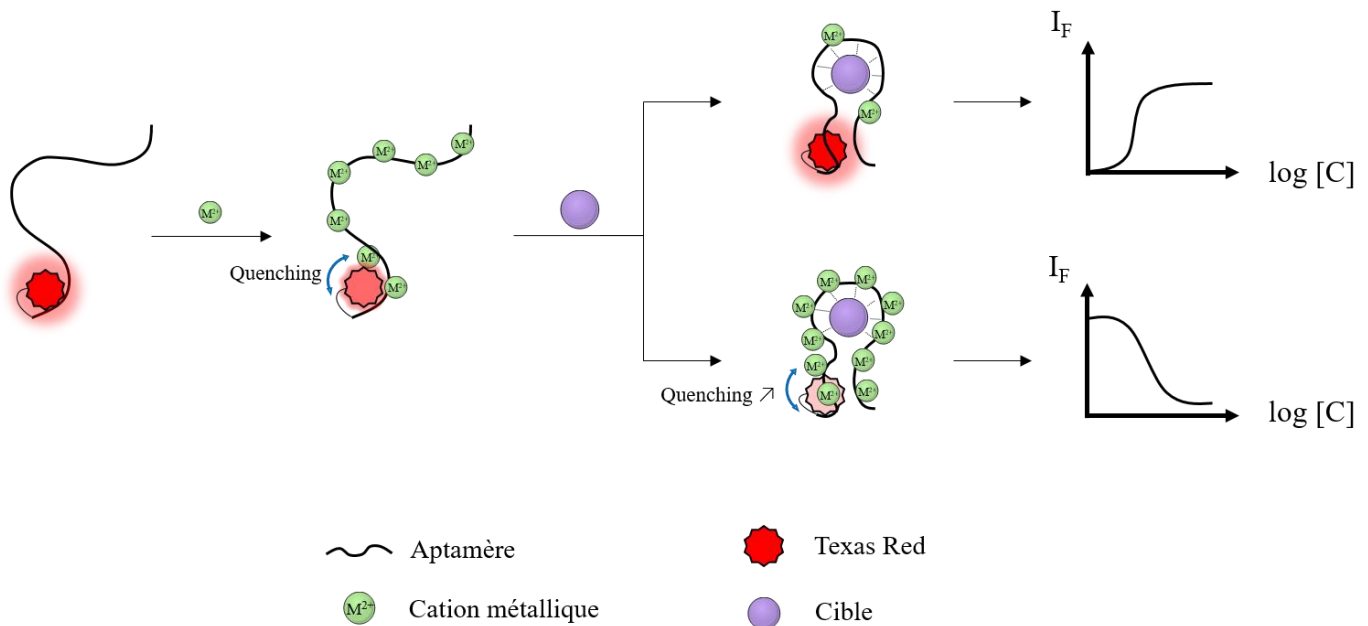
Le choix du Texas Red comme fluorophore a été guidé par des résultats expérimentaux mettant en évidence son efficacité supérieure par rapport à la fluorescéine. Cette différence peut s'expliquer par leurs propriétés physico-chimiques distinctes concernant leurs caractéristiques redox et spectrales. En outre, le caractère zwitterionique du Texas Red favorise des contacts étroits avec les bases avoisinantes par le biais d'interactions de  $\pi$ -stacking. Ainsi enchâssé dans la structure de l'aptamère, il est plus sensible aux modifications de son environnement local lors de la fixation ou du déplacement des ions métalliques quenchers.

Certaines interactions entre les ions métalliques et les acides nucléiques peuvent conduire à la création ou à l'exposition de nouveaux sites de liaison, favorisant ainsi la liaison de cations supplémentaires par un processus coopératif. Deux situations possibles sont illustrées dans la Figure 38 ci-dessous :

- Lors de l'ajout de la cible, un déplacement des ions métalliques situés à proximité du fluorophore se produit, rétablissant ainsi partiellement la fluorescence de ce dernier.



- Lors de l'ajout de la cible, une accentuation du quenching, médiée par la fixation de cations supplémentaires, est observée, se traduisant par une diminution de l'intensité de fluorescence.



**Figure 38.** Principe général d'un aptacapteur optique basé sur le quenching du Texas Red par des ions métalliques de transition.

Ces deux mécanismes distincts ont été mis en évidence en utilisant deux cibles modèles, la L-tyrosinamide et l'adénosine (267,24 g/mol). Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue *Biosensors and Bioelectronics* en Février 2022.<sup>280</sup>

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

## Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bios](https://www.elsevier.com/locate/bios)

# Detection of small molecules by fluorescence intensity using single dye labeled aptamers and quencher transition metal ions

Blandine Billet<sup>a,b,c</sup>, Benoit Chovelon<sup>a,b,c</sup>, Emmanuelle Fiore<sup>a,c</sup>, Patrice Faure<sup>a,b,c</sup>,  
Corinne Ravelet<sup>a,c,\*</sup>, Eric Peyrin<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> University Grenoble Alpes, DPM UMR 5063, F-38041, Grenoble, France

<sup>b</sup> Biochemistry, Toxicology and Pharmacology Department, Grenoble Site Nord CHU – Biology and Pathology Institute, F-38041, Grenoble, France

<sup>c</sup> CNRS, DPM UMR 5063, F-38041, Grenoble, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Fluorescence intensity  
Aptamers  
Small targets  
Quenching  
Transition metal ions

## ABSTRACT

We describe herein an aptamer-based sensing approach that signal the presence of small-molecule targets when fluorescent DNA probes are challenged with the Ni<sup>2+</sup> or Co<sup>2+</sup> quencher metal ions. Functional oligonucleotides targeting L-tyrosinamide (L-Tym), adenosine (Ade) or cocaine (Coc) were end-labeled by the Texas-Red fluorophore. A fluorescence quenching occurred upon association of these transition metal ions with the free conjugates. The formation of the target-probe complex, by the way of variations in the overall binding of quencher metal ions along the DNA strands, led to a partial restoration (for the Ade and Coc systems) or a further attenuation (for the L-Tym system) of the fluorescence intensity. The absolute signal gain varied from 40 to 180% depending on the target-probe pair investigated. The approach was also used to detect the compound Ade in a spiked biological matrix in 1 min or less. The transition metal ion-based quenching strategy is characterized by its very simple implementation, low cost, and rapid signaling.

## 1. Introduction

Aptamer-based sensors that rely on the fluorescence transduction have been extensively developed over the last twenty years (Fan et al., 2021; Ueno, 2021; Wang et al., 2011). One frequently used approach for the target binding reporting refers to the quenching of a fluorescent dye, conjugated to the aptamer, by an organic molecule (Tan et al., 2016) or a nanomaterial (Liu et al., 2014). The target-induced structural switch of the functional oligonucleotide is converted into a measurable signal change by inhibiting or more commonly restoring the fluorescent response. Despite their wide applications, these methodologies have some limitations. For organic dye-based quenching systems, the presence of two nucleic acid-tethered fluorophores may be particularly prone to side effects on the aptamer recognition properties (Wang et al., 2011). In addition, the synthesis of double-labeled oligonucleotides in aptamer beacons results in a significant cost. Regarding the quenching nanomaterials, one approach is based on the adsorption of fluorescently tagged aptamers to nanostructures, which is often constrained by the slow kinetics of the target-induced desorption of the probe from the

surface (Chang et al., 2010) as well as non-specific displacement phenomena (Lopez and Liu, 2021). Another nanomaterial-mediated quenching strategy relies on a capture DNA probe covalently linked to a quenching surface (Kahyaoglu and Rickus, 2018). However, this design requires the careful characterization and control of the surface grafting (Kahyaoglu and Rickus, 2018).

The binding of nucleic acids to metal ions is closely interconnected with the formation of their secondary/tertiary structures and their ability to exert recognition or catalytic functions (Kazakov and Hecht, 2006). Notably, the association of a DNA/RNA receptor with its target molecule can be coupled to changes in affinity and interaction sites for diverse metal ions, as previously exemplified for a variety of nucleic acid-based complexes (Challier et al., 2016; Holmstrom et al., 2014; Kazakov and Hecht, 2006; Keller et al., 2005; Marchand et al., 2015; Mikkelsen et al., 2001; Reuss et al., 2014). This may result from the restriction or exposure of metal ion-binding regions when target-induced structural rearrangements of oligonucleotides occur (Kazakov and Hecht, 2006; Marchand et al., 2015; Mikkelsen et al., 2001). Following this general concept of variations in metal ion binding

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

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

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

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114091>

Received 16 November 2021; Received in revised form 27 January 2022; Accepted 9 February 2022

Available online 17 February 2022

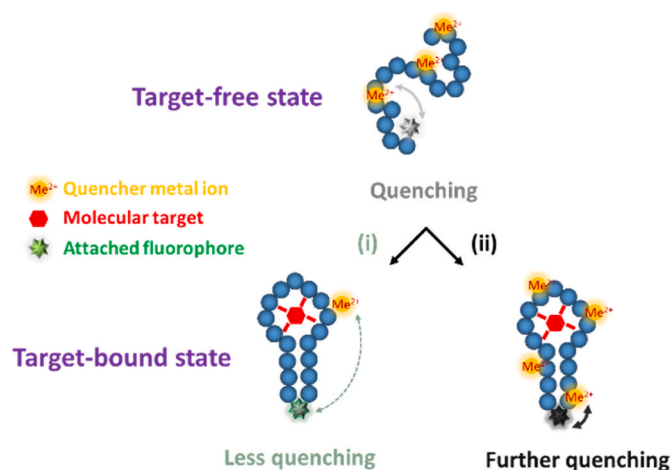
0956-5663/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

when the nucleic acid structure/conformation changes, our group has recently reported a novel DNA aptamer-based assay design dedicated to small-molecule sensing (Billet et al., 2021). The binding of certain post-transition/transition metal ions to the aptamer was found to oppose that of its target and concomitantly lead to an improved structural switching process to signal the presence of the analyte. The employed readout technique relied on fluorescence anisotropy (FA) by using an aptamer end-labeled by the peculiar fluorescein dye as tracer. In the free form, the probe was subjected to neutralization of the backbone negative charges by metal ions. This resulted in improved contacts between the anionic fluorophore and the DNA molecule, which produced an enhancement in the FA output through rotational coupling between the two partners. Upon target binding, the repulsion between the attached fluorescein and the backbone was partially recovered due to the release of complexed metal ions, restoring its intrinsic motion and then lowering the signal in an analyte-dependent manner.

Although this assay scheme has proven successful for several target-aptamer systems, a number of limitations may be recognized. Of the metal ions examined, only the  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  elements with sufficient potential for perturbing DNA structure were found to be reactive. Indeed, the approach failed to capture modifications in the binding of transition metal ions that display poorer switching activity to DNA (Billet et al., 2021). Furthermore, only fluorophores with a high localized rotational component, *i. e.* negatively charged and with a small ring system, could be effective reporters (Billet et al., 2021). Given these two issues, the assay reveals a definite lack of versatility and a restricted capacity to screen the ion behavior, additionally offering limited possibilities for multiplexed analysis. At this stage, the implementation of alternative transition metal ions that would manifest a novel signaling mechanism toward fluorescent DNA conjugates is therefore highly desirable. Some transition elements are known to exhibit significant fluorescence quenching activities (Kemlo and Shepherd, 1977). These properties have found useful applications in a variety of fields, ranging from the design of metal-dedicated sensors (Mei et al., 2021; Ngoror-abanga et al., 2019) to the structural analysis of proteins (Yu et al., 2013). For a long time, the quenching features of transition metal ions have only been considered as potential interferences in the development of molecule sensors based on fluorescence signaling aptamers (Rupcich et al., 2006). More recently, the quenching properties as well as the single-stranded DNA binding features of  $\text{Cr}^{3+}$  have been taken advantage of to design a fluorescent metal ion-based molecular beacon for DNA detection (Ma et al., 2017).

In the present paper, using specifically the  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  transition metal ions, we introduced a new signaling mode that is based not on the rotational functionality of the reporter but on the quenching of its fluorescence emission. We found that Texas-Red, an electrically neutral fluorophore, is more efficient than fluorescein for detecting target-induced changes in quencher interactions with DNA aptamers. This particular transduction mechanism allowed us to extend the scope of the assay to a broader spectrum of transition metal ions, whose DNA binding and switching capabilities differ appreciably from those of the previously exploited  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  species. The general principle is presented in Fig. 1. In the target-free state of the probe, the fluorescence intensity (FI) is attenuated by the DNA-cation interaction that leads to the positioning of quenchers in the vicinity of the dye (Atherton and Beaumont, 1986; Rupcich et al., 2006). Depending on the nature of the different components involved in the reaction, a reduction or an increase in the metal ion binding along the DNA strand could occur upon addition of the target, then triggering a positive or negative change in the FI signal of the reporter, respectively (Fig. 1).

In the first stage of this work, we compared the influence of many post-transition/transition metal ions on the fluorescent response of the anti-L-tyrosinamide (L-Tym) DNA aptamer conjugated to two classes of reporters, *i. e.* fluorescein (F) or the Texas-Red (TR).  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  were shown to be the most efficient quenchers in both cases. We next established that the assay strategy can preferentially operate with



**Fig. 1.** Schematic representation of the quencher metal ion-based signaling approach. In the free state of the tracer, the fluorescent intensity is diminished by the quencher binding to DNA. The formation of the target-aptamer complex could cause a decrease (i) or an increase (ii) in the binding of quenchers along the strand, leading to an analyte-dependent change in the fluorescent signal.

the TR conjugate in the presence of  $\text{Ni}^{2+}$  or  $\text{Co}^{2+}$ , leading to a further quenching process upon L-Tym addition. The approach was also demonstrated for the adenosine (Ade) and cocaine (Coc) analytes and their corresponding TR-labeled DNA aptamers, implying a reversed phenomenon through a partial restoration of the fluorescence emission signal in the presence of targets. Finally, we showed that the Ade sensor could quickly work under realistic conditions.

## 2. Experimental section

### 2.1. Reagents

L-Tyrosinamide (L-Tym), adenosine (Ade), guanosine (Gua), 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES),  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$ , and  $\text{MnCl}_2$  were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). D-tyrosinamide (D-Tym) was provided from Iris Biotech (Marktredwitz, Germany). Cocaine (Coc) and benzoylecgonine (BZE) were supplied by Lipomed AG (Arlesheim, Switzerland).  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$  and  $\text{ZnCl}_2$  were supplied by ProLabo (Paris, France) and  $\text{MgCl}_2$  was purchased from Roth (Lauterbourg, France). NaOH was received from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). Free F and TR fluorophores were ordered from Sigma-Aldrich and Acros Organics (Geel, Belgium), respectively. Water was obtained using a Direct-Q® 3UV water purification system (Merck Millipore, Guyancourt, France). The metal ion and analyte stock solutions were prepared in pure water. The MES buffer was prepared to the desired pH by titrating the free acid with sodium hydroxide. Labeled DNA oligonucleotides were synthesized, HPLC-purified and identified by MALDI-TOF mass spectrometry by Eurogentec (Seraing, Belgium). The stock solutions of oligonucleotides were prepared in pure water at  $10^{-3}$  M and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use. The DNA oligonucleotides used in the present work are listed in Table S1.

### 2.2. Measurements

As previously reported (Billet et al., 2021), fluorescence intensity and fluorescence anisotropy were taken on a Tecan Infinite F500 microplate reader (Mannedorf, Switzerland) using black, 96-well Greiner Bio-One microplates (Courtaboeuf, France). Excitation was set at 485 or 585 nm, and emission was collected at 535 or 635 nm for the F and TR fluorophores (free or DNA-conjugated), respectively.

### 2.3. Metal ion titration of probes

The binding buffer consisted of 50 mM MES, pH 6.3, unless otherwise stated. The working aptamer solutions were obtained by adequate dilution of the stock solution in 10X concentrated binding buffer, with or without target. Prior to the first utilization, the working solutions were heated at 80 °C for 5 min and left to stand at room temperature for 30 min in the dark. Successive dilutions of each metal ion stock solution were made in the binding buffer. The aptamer and metal ion working solutions were mixed into the individual wells of a microplate (final volume = 100  $\mu$ L). All experiments were done at 23 °C. Blank wells received 100  $\mu$ L of the binding buffer. Each well on the first three rows then received 50  $\mu$ L of the aptamer solution and 50  $\mu$ L of the metal ion solution. On three other rows, each well received 50  $\mu$ L of the aptamer solution challenged with 1 mM target (final concentration) and 50  $\mu$ L of the metal ion solution. The final concentration of the aptamer probe and metal ions was 30 nM and from 0 to 400  $\mu$ M, respectively. The microplate was then placed into the microplate reader for FI and FA measurements.

### 2.4. Dose-response curves using TR conjugates

Successive dilutions of L- or D-Tym stock solutions were made in the binding buffer. In a microplate, 50  $\mu$ L/well of the TR-apt-T or control probe solution containing NiCl<sub>2</sub> or CoCl<sub>2</sub> at a final concentration of 4  $\mu$ M and 50  $\mu$ L/well of the L- or D-Tym solution (final concentration from 0 to 800  $\mu$ M) were mixed before reading. We carried out similar experiments for Ade or Gua and Coc or BZE (final concentration from 0 to 1 mM) by implementing the TR-apt-A and TR-apt-C (or control) probes, respectively, in the presence of Ni<sup>2+</sup> and/or Co<sup>2+</sup>. We used the same binding buffer as metal ion titration experiments.

### 2.5. Analysis of urine samples and kinetic study

Pooled human urine (batch number: 20BCE08) was purchased from ProBioQual (Lyon, France). The urine sample was first centrifuged at 5650 rpm for 10 min. The supernatant was then filtered through 0.45  $\mu$ m membranes and diluted 20-fold in the 50 mM MES buffer spiked with Ade (final concentration from 0 to 1 mM). Three replicate samples were analyzed by using 5'-TR-apt-A in the presence of 40  $\mu$ M Ni<sup>2+</sup>. The kinetic study was carried out using diluted urine samples. The Ade target (final concentration of 0 or 200  $\mu$ M) was immediately introduced into the wells containing the probe and 40  $\mu$ M Ni<sup>2+</sup>. The reading process was started as quickly as possible (delay time of about 1 min after manual introduction of the microplate into the reader) and measurements were performed through a kinetic run during 15 min, with an interval time of 30s between two successive readings.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Selection of quencher metal ions

Some previous works have established that the degree of fluorescence emission quenching for dye-DNA conjugates is highly dependent on the nature of metal ions. As an example, the fluorescent signal of F-labeled oligonucleotides is found to be very strongly inhibited by 100  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup> whereas other elements such as Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> or Cd<sup>2+</sup> give no or much more limited intensity changes at the same concentration (Li et al., 2017). In addition, using different buffer and F-tagged DNA molecules, Brennan and co-workers have reported that Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> constitute more efficient quenchers than Mn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> (Rupcich et al., 2006). A variety of dynamic and static mechanisms can be at the origin of the emission quenching by transition metal ions. These notably include ground state complexation, heavy atom effect, electron transfer, Dexter interactions and resonance energy transfer (Birch et al., 1993; Kemlo and Shepherd, 1977; Varnes et al., 1972; Yu et al., 2013), which

may be combined in a complex way in the overall phenomenon (Varnes et al., 1972). According to specific mechanistic studies on fluorescent DNA probes (Atherton and Beaumont, 1986; Bregadze et al., 2002; Rupcich et al., 2006), the main processes involved in emission quenching are electron transfer and resonance energy transfer. As such, the reactivity of quencher transition metal ions should arise primarily from their ability to accept electrons from the donor fluorophore and, for colored species acting as potential energy acceptors (including Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup>), from their degree of spectral overlap with the dye.

For selecting quencher cations, the kinetics of the metal ion interaction with DNA should also be considered with great attention. Liu and colleagues have notably shown that the Cr<sup>3+</sup> quencher displays very slow ligand-exchange rates (Li et al., 2017; Ma et al., 2017), which means that such type of species could not be convenient for our sensing scheme.

In order to choose the most promising quencher metal ions, we initially used as model tracers the 23-mer L-Tym aptamer (apt-T) conjugated, at its 3' extremity, to either F or TR (3'-F-apt-T and 3'-TR-apt-T, Table S1). As compared to F, TR has very distinct chemical and spectral characteristics that may have important implications on its reactivity toward quencher metal ions. First, TR is zwitterionic and contains a large fused ring system, while F is anionic and has a smaller multiple-ring moiety (Unruh et al., 2005a). As the result, TR can engage tighter and larger contacts with neighboring nucleobases (Jahnke et al., 2021; Unruh et al., 2005b), at the extent that it could even be trapped inside the oligonucleotide (Jahnke et al., 2021). So, the two attached dyes are assumed to be dissimilarly surrounded by the DNA moieties, and thus by the metal ions bound to them, so that a different distance-dependent quenching process could occur (Atherton and Beaumont, 1986; Rupcich et al., 2006). Second, the two dyes possess non-identical redox properties (Doose et al., 2009), which have a substantial impact on the electron transfer-based quenching process (Kemlo and Shepherd, 1977). Third, the emission spectrum of the TR dye is shifted to a higher maximum wavelength relative to the F fluorophore (620 nm vs 525 nm), resulting in a differential sensitivity toward a potential resonance energy transfer mechanism (Bregadze et al., 2002; Kemlo and Shepherd, 1977; Yu et al., 2013).

The Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> cations, which potentially cover a large range of quenching activity while displaying a fast ligand-exchange ability, were then brought into contact with probes at 30 nM (Fig. 2). The binding buffer (50 mM MES, pH = 6.3) was chosen because of (1) its very low metal ion complexation characteristics and

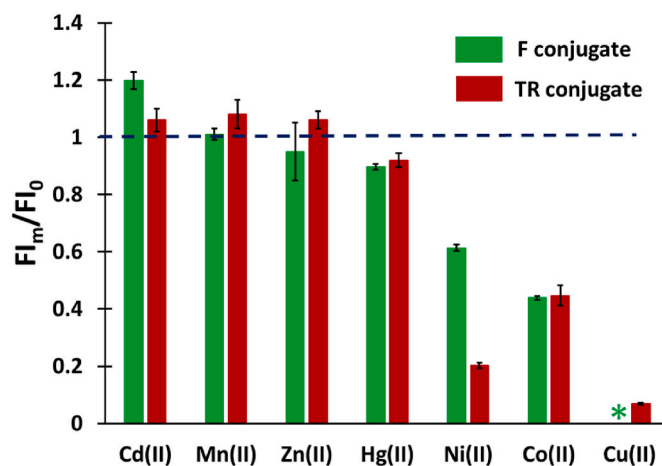


Fig. 2. Effects of metal ions (400  $\mu$ M) on the response of the 3'-F-apt-T and 3'-TR-apt-T probes (30 nM). 50 mM MES buffer. FI<sub>m</sub> and FI<sub>0</sub> are the fluorescence intensity in the presence and absence of metal ions, respectively (\* a nearly complete quenching was recorded for 3'-F-apt-T with micromolar concentrations of Cu<sup>2+</sup>, see also Fig. 3). Error bars represent the standard deviation from three independent experiments.

(2) the slightly acidic conditions that are suitable for avoiding metal hydroxide precipitation (Billet et al., 2021). The 3'-TR-apt-T and 3'-F-apt-T probes were shown to undergo small and somewhat irregular FI variations in the presence of 400  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  or  $\text{Mn}^{2+}$ , confirming some previous observations (Billet et al., 2021). A more substantial effect occurred when  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  or  $\text{Co}^{2+}$  were added to the reaction solution. For the F conjugate, it varied from  $\sim 40\%$  quenching for  $\text{Ni}^{2+}$  to  $\sim 100\%$  quenching for  $\text{Cu}^{2+}$ . The influence of  $\text{Ni}^{2+}$  on the response of the TR conjugate was more important (FI was divided by about 5), while a less pronounced, but still highly significant, quenching effect was seen for  $\text{Cu}^{2+}$  (Fig. 2). Control experiments with free (unconjugated) fluorescein and Texas-Red fluorophores showed that this quenching process is conditioned by the binding of the metal ions to DNA (Fig. S1), in accordance with earlier data (Li et al., 2017; Rupcich et al., 2006).

Considering all these results, we then focused on the  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  quenchers for investigating their signaling potential in the assay scheme (Fig. 1).

### 3.2. Quencher metal ion-based detection of L-Tym

#### 3.2.1. Responsivity of 3'-TR-apt-T and 3'-F-apt-T probes

Once the quencher metal ions selected, we performed the metal ion

titration of the two probes (from 0 to 400  $\mu\text{M}$ ), in either their free or target-complexed form (L-Tym at the 1 mM concentration).

As depicted in Fig. 3, the addition of increasing amounts of  $\text{Cu}^{2+}$  resulted in a drastic decrease in the FI signal of both conjugates, not only in the free state (Fig. 2) but also in their L-Tym-complexed form. The  $\text{Cu}^{2+}$  titration curves of 3'-F-apt-T and 3'-TR-apt-T were not significantly affected by the presence of the target. Our previous study has shown that the addition of L-Tym does not alter the ability of soft metal ions such as  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Ag}^+$  to interact with apt-T (Billet et al., 2021). The preferential binding of these cations to nucleobases (Hackl et al., 2005; Sissoeff et al., 1976) determines the dramatic disruption of the active structure of DNA (Zhou et al., 2010), which defeats the L-Tym-oligonucleotide association.  $\text{Cu}^{2+}$  has a binding preference for bases close to those of  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Ag}^+$  metal ions (Hackl et al., 2005) and thereby can also cause severe disorganization in DNA structures (Eichhorn and Shin, 1968). Hence, the L-Tym-bound form of the aptamer probes might be also completely disadvantaged by the interaction of  $\text{Cu}^{2+}$  with DNA.

Compared to  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  exhibits a much lower nucleobase-to-phosphate binding affinity ratio, which approximates that of hard metal ions more than that of soft metal ions (Eichhorn and Shin, 1968; Hackl et al., 2005; Sissoeff et al., 1976). As such, their impact on nucleic acid architectures is generally more weighted and balanced (Sissoeff et al., 1976), fluctuating between stabilizing (Eichhorn and Shin, 1968;

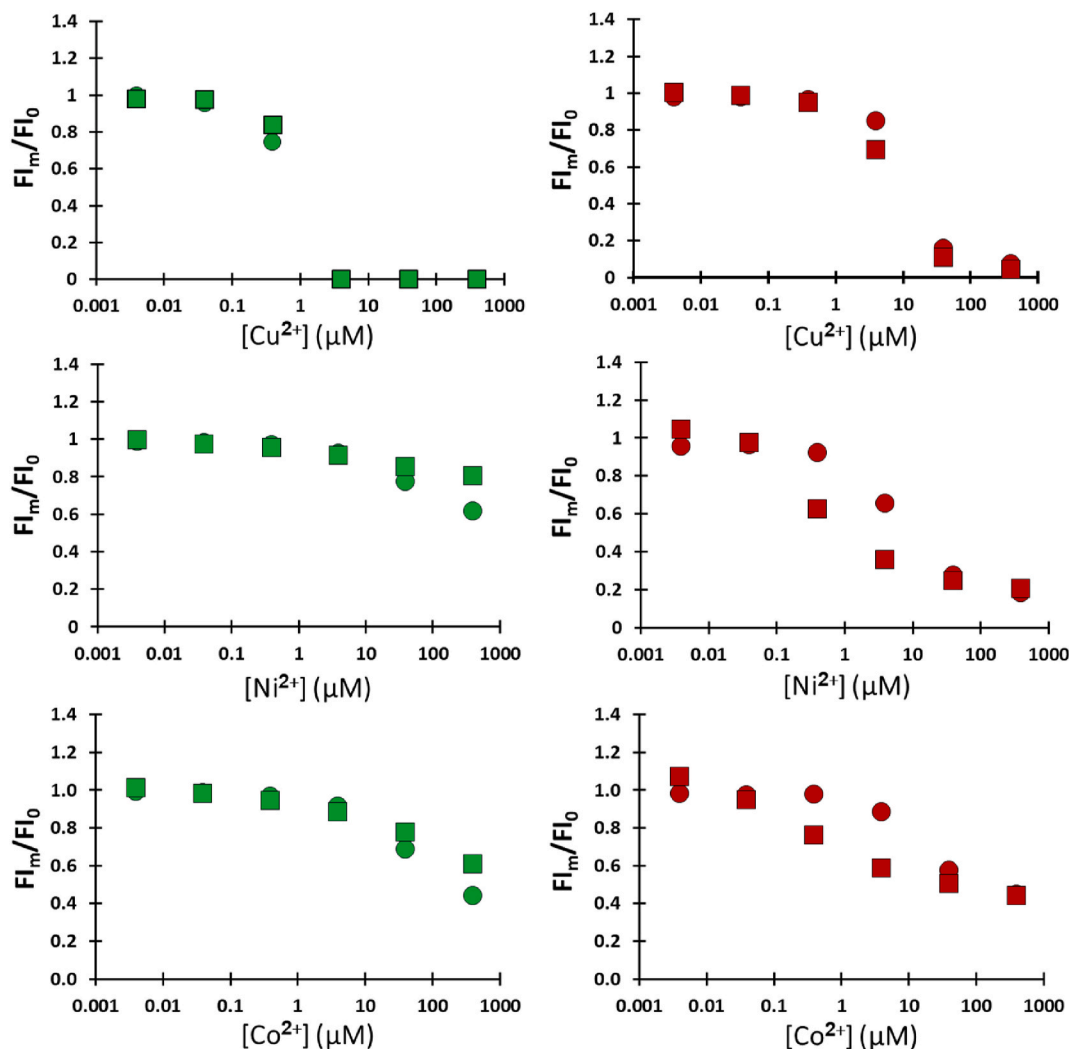


Fig. 3. Metal ion titration of the 3'-F-apt-T (left) and 3'-TR-apt-T (right) probes in the absence (circle) and presence (square) of L-Tym (1 mM). 50 mM MES buffer.  $\text{FI}_m$  and  $\text{FI}_0$  are the fluorescence intensity in the presence and absence of metal ions, respectively. Error bars represent the standard deviation from three independent experiments.

Sorokin et al., 2001) and destabilizing (Sorokin et al., 2001) effects related in part to the nature and structure of the DNA. It is thus unlikely that these metal ions would induce total neutralization of the target-aptamer association. We recorded  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  titration curves that differ as a function of the probes. For the F conjugate, we did not clearly achieve saturation of the fluorescence quenching process in the concentration range of the metal ions, in the absence or presence of the target (Fig. 3). The FI variations appear to be in concert with an only slight change in the titration curves upon addition of L-Tym, revealing that the metal ion binding capacities of the free and target-bound states of 3'-F-apt-T are poorly differentiable over the range tested. In contrast, the quenching due to  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  reached saturation for both free and target-bound 3'-TR-apt-T, and was paralleled by a noticeable shift of the metal ion titration curves to the left in the presence of L-Tym (Fig. 3). This suggests that the association between the target and the TR-labeled aptamer is coupled to an enhanced stability of binding between metal ions and DNA. The observation is similar to what is often retrieved for functional nucleic acids when they are challenged with conventional stabilizing cations such as the  $\text{Mg}^{2+}$  hard metal ion (Challier et al., 2016; Holmstrom et al., 2014; Reuss et al., 2014).

Given the distinct L-Tym-dependent response of 3'-F-apt-T and 3'-TR-apt-T in the presence of  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$ , it is apparent that, beyond its role in the extent of quenching, the nature of the dye has a crucial weight on the target signaling ability of the probe (see also below for the two other investigated systems). As discussed above, TR can share a wider area of contacts with the DNA chain than F (Jahnke et al., 2021; Unruh et al., 2005b), which would make the reporter capable of more intimately probing target-induced perturbations in the binding of quenchers to DNA sites. Moreover, these findings are in accordance with other data collected for fluorescently labeled proteins, which respond to target-mediated conformational changes in different ways depending on the type of grafted fluorophores that are faced with quencher transition metal ions bound to nearby regions (Yu et al., 2013).

To further appreciate the potential of the quenching-based assay scheme presented here, we analyzed the data through exactly the same readout approach implemented in our previous work, namely the FA technique (Billet et al., 2021). On one hand, we recorded a significant enhancement in the FA output with the target-free 3'-TR-apt-T upon addition of  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Ni}^{2+}$ , the FA variation spanning the 0.060–0.100 range (Fig. S2). The FA gain can be closely correlated with the degree of fluorescence quenching (Fig. S2). This supports that the fluorescence lifetime shortening, which is well known to occur when dye emission is quenched by  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  metal ions (Atherton and Beaumont, 1986; Rupcich et al., 2006), is most directly involved in the anisotropy increase (Zhang et al., 2012). Such event was concomitant with a substantial target-dependent FA response of 3'-TR-apt-T for the two quenchers (Fig. S2). On the other hand, 3'-F-apt-T responded more weakly to the addition of metal ions, as illustrated by the FA increase ranging from only 0.010 ( $\text{Co}^{2+}$ ) to 0.040 ( $\text{Ni}^{2+}$ ) (Fig. S2). The small change in anisotropy for  $\text{Ni}^{2+}$  appears to come straight from its rather modest quenching effect on the F emission while the very limited FA variation seen with  $\text{Co}^{2+}$  suggests the involvement of a proper depolarization process (Figs. 3 and S2). In any case, 3'-F-apt-T exhibited no differential behavior in the absence or presence of L-Tym (Fig. S2). All data emphasize that the TR conjugate also responds in FA more sensitively not only to the binding of the quencher metal ion but also to its fluctuations depending on the formation of the L-Tym-apt-T complex.

### 3.2.2. Effects of the label position and aptamer length on the probe responsivity

We next assessed the influence of the terminal position of the fluorophores on the reactivity of the probes using the representative  $\text{Ni}^{2+}$  quencher. The 5' end TR and F conjugates of apt-T (5'-TR-apt-T and 5'-F-apt-T, Table S1) showed FI changes upon quencher binding as well as L-Tym dependent responses close to those reported with the corresponding 3'-end conjugates (Fig. S3 vs Fig. 3). The results indicate that the

terminal location of the reporter does not significantly alter the responsivity features of the apt-T probe.

In contrast, the use of a longer version of apt-T, *i. e.* one aptamer sequence bearing an additional 15-mer strand at the 5' end (Challier et al., 2016) (5'-TR-apt-T-L, Table S1), resulted in the complete loss of the L-Tym-dependent titration curve shift (Fig. S3). The supplementary region could act by altering the overall shape of the aptamer or, if it is rather inert toward it, by shielding changes in the  $\text{Ni}^{2+}$  binding to the 23-mer motif.

### 3.2.3. Dose-response curves using TR conjugates

Considering the favorable curve shift obtained with 3'-TR-apt-T, we then decided to titrate this TR-labeled aptamer with increasing amounts of L-Tym, in the presence of 4  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  or  $\text{Co}^{2+}$  (Fig. 4). For comparison, the dose-response curve in the absence of these metal ions is also depicted in Fig. S4. In such a case, only a small FI increase (less than 8%) was measured upon exposure of 800  $\mu\text{M}$  L-Tym. As expected from the metal ion titration curves (Fig. 3), the probe operated through further fluorescence quenching (~40–50%) upon addition of target. The assay specificity was assessed by testing the non-cognate D-Tym enantiomer as well as a non-binding DNA probe of similar length (5'-TR-apt-A, Table S1). The FI signal was roughly invariant over the analyte concentration range, demonstrating that the fluorescent response of the 3'-TR-apt-T sensor is related to the target-aptamer recognition process.

We next investigated the influence of adding metal ions typically used in the aptamer binding solutions, *i. e.* the alkali  $\text{Na}^+$  and alkaline

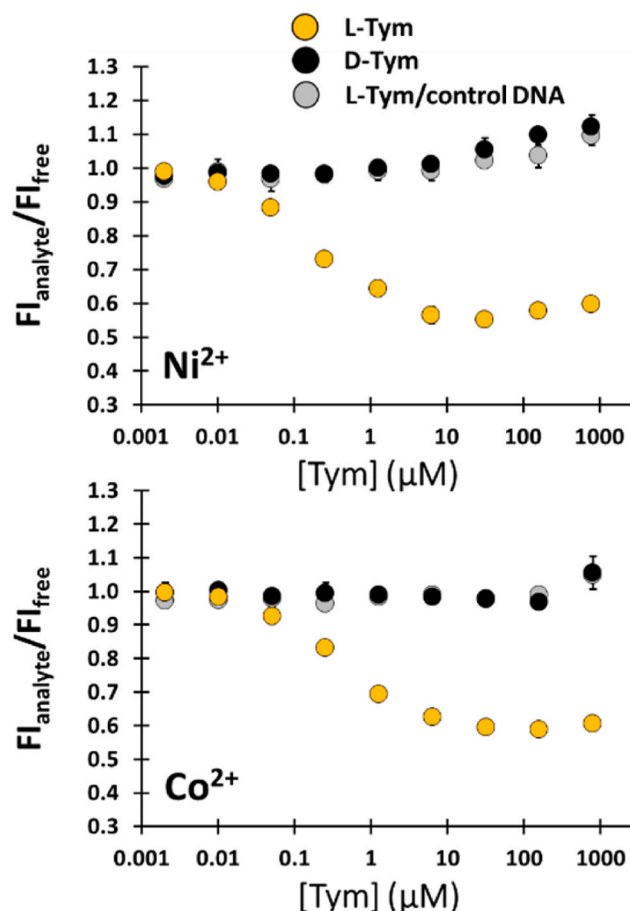


Fig. 4. Dose-response curves of the 3'-TR-apt-T and control DNA probes for the L- or D-Tym analytes, in the presence of 4  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  or  $\text{Co}^{2+}$ , 50 mM MES buffer.  $\text{FI}_{\text{analyte}}$  and  $\text{FI}_{\text{free}}$  are the fluorescence intensity in the presence and absence of analyte, respectively. Error bars represent the standard deviation from three independent experiments.

earth  $Mg^{2+}$ , on the 3'-TR-apt-T response.  $Ni^{2+}$  at 4  $\mu M$  was used as quencher. For the analysis of the  $Na^+$  effects, the MES buffer was varied from 50 to 500 mM, corresponding to a change in  $[Na^+]$  from  $\sim 30$  to  $\sim 300$  mM. For its part,  $Mg^{2+}$  was introduced into the 50 mM MES buffer at a concentration up to 5 mM. As shown in Fig. S5, a significant decrease in signal gain was reported with these two species at their highest concentration. The impact of these added cations on the ionic atmosphere of the DNA is thought to determine a reduced association of the quencher ion with apt-T (Draper, 2004) and thus a deterioration of the signaling process. The significant effect observed even at a low amount of  $Mg^{2+}$  could denote a specific competition of this divalent cation with  $Ni^{2+}$  for its DNA binding sites (Kazakov and Hecht, 2006).

When challenged with  $Ni^{2+}$  or  $Co^{2+}$ , the binding of 3'-TR-apt-T to L-Tym leads to an apparent  $K_d$  in the 0.13–0.34  $\mu M$  range (Table S2). As a point of comparison, the dissociation constant of the complex between L-Tym and unmodified apt-T is around 10  $\mu M$  under  $Mg^{2+}$ -free reaction conditions (Challier et al., 2016). This reveals that the simple addition of  $Ni^{2+}/Co^{2+}$  to the reaction solution at a low micromolar concentration results in a highly stabilized target binding state. As the result, the detection limit (determined from a signal-to-noise ratio  $>3$ ) for L-Tym was 10 nM in the presence of the  $Ni^{2+}$  quencher, the lowest ever reported for homogeneous-phase aptasensors without signal amplification (Billet et al., 2021). It was associated to a linear range extending to 250 nM (Fig. S6).

Finally, we also performed dose-response experiments by using the 5'-end TR conjugate in the presence of 4  $\mu M$   $Ni^{2+}$ . We found that the overall signal variation is roughly equivalent to that reported with 3'-TR-apt-T under the same conditions, demonstrating that the terminal location of TR has a minimal effect on sensor efficiency and apparent affinity of L-Tym for apt-T (Table S2).

### 3.3. Quencher metal ion-based detection of Ade

In order to explore the generalizability of the sensing approach, we next tested our method on another target-aptamer pair. We focused on the very widely studied anti-adenosine (Ade) 25-mer DNA aptamer (apt-A) that exhibits a different binding motif relative to apt-T (hairpin-like for apt-A (Durand et al., 2014) vs no stable structure for apt-T (Challier et al., 2016)).

The F/TR conjugates at the 5' end (5'-F-apt-A/5'-TR-apt-A, Table S1) and the  $Ni^{2+}/Co^{2+}$  ions were initially used as probes and quenchers, respectively. The metal ion titration curves of the two probes were constructed in the absence or presence of Ade (1 mM, Fig. 5). Similarly to what was observed for the L-Tym system, the metal ion-dependent FI signal of the F conjugate was approximately insensitive to the presence of target. In contrast, we noticed a substantial rightward shift in the titration curves of the TR conjugate upon exposure of Ade. The result agrees with a reduced ability of 5'-TR-apt-A to associate with these metal ions in its bound form. This follows the trend encountered for various aptamers facing stronger base binders, *i. e.* the softer  $Cd^{2+}$  or  $Pb^{2+}$  species (Hackl et al., 2005; Sissoeff et al., 1976), where the target-bound DNA state opposes that complexed to metal ions (Billet et al., 2021).

In accordance with the results from the L-Tym system, the TR conjugate was found to be more conductive than the 5'-F-apt-A tracer to sense the formation of the Ade-apt-A complex through FA readout (Fig. S7). Furthermore, using the aptamer carrying the labels at the other extremity (3'-TR-apt-A and 3'-F-apt-A, Table S1) in the presence of  $Ni^{2+}$  gave a trend in FI similar to that of the 5'-end conjugates (Fig. S8), although the Ade-dependent response obtained with 3'-TR-apt-A was not as pronounced as that of 5'-TR-apt-A (Fig. 5).

The reactivity of the Ade-apt-A complex toward  $Ni^{2+}/Co^{2+}$  ions is shown to be reversed relative to that observed with the L-Tym-apt-T complex. Given that these metal ions react with phosphates and nucleobases in a somewhat balanced way (see above), we could propose that

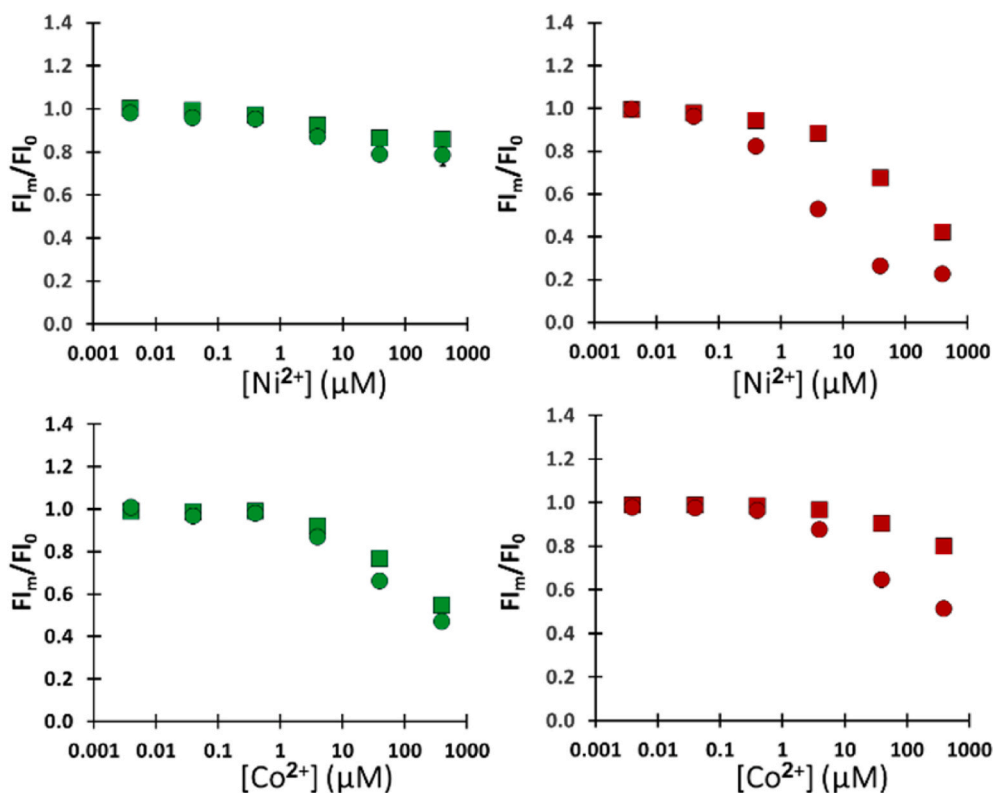


Fig. 5. Metal ion titration of the 5'-F-apt-A (left) and 5'-TR-apt-A (right) probes in the absence (circle) and presence (square) of Ade (1 mM).  $FI_m$  and  $FI_0$  are the fluorescence intensity in the presence and absence of metal ions, respectively. 50 mM MES buffer. Error bars represent the standard deviation from three independent experiments.

one of these contributions predominates over the other on a case by case basis, depending on the binding sequence and target-induced conformational rearrangements (large for apt-T (Challier et al., 2016) vs moderate for apt-A (Xia et al., 2013)) of the aptamers.

The dose-response curves for Ade using 5'-TR-apt-A, recorded by using a medium containing 40  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  or 400  $\mu\text{M}$   $\text{Co}^{2+}$ , are depicted in Fig. 6. Of note, no significant FI change was reported upon addition of Ade in the absence of transition metal ions (Fig. S4). In accordance with the metal ion titration data observed with or without Ade, the curve exhibited a partial restoration of the fluorescence intensity upon exposure of increasing amounts of the target. The fluorescence signal was enhanced by  $\sim 180\%$  at 1 mM target in the presence of 40  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  while a lower but still exploitable FI increase ( $\sim 60\%$ ) was measured with 400  $\mu\text{M}$   $\text{Co}^{2+}$ . The assay response was also shown to be Ade binding-specific as the non-cognate guanosine (Gua) analyte and a control probe (3'-TR-apt-T) provided no significant FI variations in the presence of the two quenchers.

Because of the counteracting probe-binding effects of Ade and  $\text{Ni}^{2+}$ / $\text{Co}^{2+}$  ions (Billet et al., 2021), the affinity of 5'-TR-apt-A for the target was rather reduced in the presence of quencher cations. Indeed, we determined an apparent  $K_d$  varying from 105 to 155  $\mu\text{M}$  (Table S2) while the dissociation constant of the native complex is around 10  $\mu\text{M}$  in  $\text{Mg}^{2+}$ -free conditions (Gulbakan et al., 2018). Consequently, a somewhat high detection limit was found (8  $\mu\text{M}$  by using the  $\text{Ni}^{2+}$  quencher). However, the value satisfactorily compares with those estimated from a

number of quencher-based fluorescent aptamer assays for Ade and related targets (Kahyaoglu and Rickus, 2018; Lopez and Liu, 2021; Nutiu and Li, 2003). As shown in Fig. S6, the linear range of the assay was 0–200  $\mu\text{M}$ .

Here again, further dose-response experiments were carried out using the 3'-TR-apt-A tracer in the presence of 40  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$ . Although a smaller signal gain was realized compared to 5'-TR-apt-A (55% vs 180% increase in FI), the sensor nevertheless operates with an identical apparent affinity between Ade and apt-A (Table S2).

### 3.4. Quencher metal ion-based detection of Coc

To further consider the generic potential of the strategy, we finally decided to concentrate on the anti-cocaine (Coc) 30-mer DNA aptamer (apt-C) that displays another type of binding motif, *i. e.* a three-way junction structure (Billet et al., 2021). In this context, we implemented four TR/F conjugates (5'-TR-apt-C, 5'-F-apt-C, 3'-TR-apt-C and 3'-F-apt-C, Table S1) and the  $\text{Ni}^{2+}$  quencher ion. All the experimental results are depicted in Figs. S6, S9, S10 and Table S2. To briefly summarize, we observed that (1) the TR conjugates can specifically respond to the target with a better signal gain than the F probes (Fig. S9) and (2) the signaling behavior resembles that of the Ade system, but with a lesser signal gain (approximately 60%) upon target binding (Fig. S10 and Table S2).

### 3.5. Potentialities for complex sample analysis

We assessed the capability of our sensor to work under real-life conditions. We chose the Ade-5'-TR-apt-A pair and a biological fluid as study model. A 5% human urine sample was spiked with the Ade analyte at different concentrations, in the presence of 40  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$ . The Ade dose-response curve was then constructed as depicted in Fig. S11. The normalized response was shown to be comparable to that recorded in buffered solution, suggesting that the sensor could retain its activity in diluted complex matrices.

The time-dependent FI output of 5'-TR-apt-A upon addition of 200  $\mu\text{M}$  Ade to the urine sample was also recorded. We found that the reaction equilibrium can be reached in a short period of time, *i. e.* within 1 min or less (Fig. S11). This data demonstrates that the aptasensor is able to promptly respond to the presence of the target, even in a realistic medium.

## 4. Conclusion

In summary, we have demonstrated that  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  transition metal ions can be used as fluorescence quenchers for designing sensors through their differential sensitivity to the free vs bound state of TR-conjugated aptamers. Unlike the previously deployed  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  elements (Billet et al., 2021),  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  appear to be particularly suitable, given their position in the classification of base-to-phosphate binders (Hackl et al., 2005), for either favoring or opposing the formation of target-aptamer complexes. In this regard, we have found with interest that these two metal ions, which are not generally used for this purpose in the aptamer field, greatly stabilize the target-bound state of the TR-apt-T probes, leading to a very strong improvement in the binding affinity (by a factor of about 100 in the presence of  $\text{Ni}^{2+}$ ). This point emphasizes that certain transition elements, preferentially those with not too strong affinity for nucleobases, could be an alternative to the usual alkaline earth ions such as  $\text{Mg}^{2+}$  or  $\text{Ca}^{2+}$  for stabilizing some peculiar active aptamer structures (Keller et al., 2005; Zimmermann et al., 2000).

Small-molecule binding aptamers, labeled with a single dye at one extremity, most often generate limited FI responses under the direct signaling configuration due to small target-induced alterations in the terminal DNA regions (Jhaveri et al., 2000; Merino and Weeks, 2005; Stojanovic et al., 2001; Zhao et al., 2014). The addition of quencher

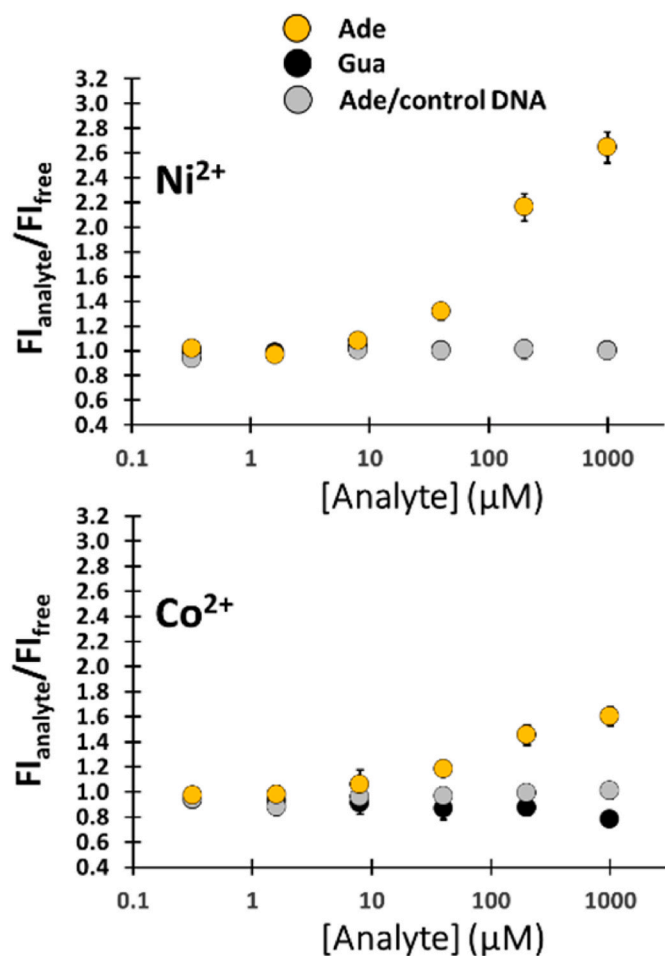


Fig. 6. Dose-response curves of the 5'-TR-apt-A and control DNA probes for the Ade or Gua analytes, in the presence of 40  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  or 400  $\mu\text{M}$   $\text{Co}^{2+}$ .  $\text{FI}_{\text{analyte}}$  and  $\text{FI}_{\text{free}}$  are the fluorescence intensity in the presence and absence of analyte, respectively. 50 mM MES buffer. Error bars represent the standard deviation from three independent experiments.



transition metal ions to the binding solution provides a useful route to promote signal output for aptamer probes that display no or minimal responsivity, as exemplified in Figs. S4 and S10. Furthermore, despite the fact that the use of these transition metal ions requires some precautions in terms of handling and waste management, the current design provides a simpler and/or less expensive method compared to the most commonly used quenching strategies in aptasensor development. Although the implementation of the TR reporter through the current design is particularly advantageous for detecting target-induced changes in aptamer-bound quenchers, the absolute signal gain achieved for the three systems studied here remains still moderate (ranging from 40 to 180%). Future works will therefore focus on screening a wider range of fluorophores to select better reporter/quencher ion combinations.

## Funding

We acknowledge the support of NeuroCoG (ANR-15-IDEX-02), (ANR-17-EURE-0003), and Polynat Carnot Institute (ANR-11-CARN-007-01).

## CRedit authorship contribution statement

**Blandine Billet:** Methodology, Validation, Data curation, Investigation, Writing – original draft. **Benoit Chovelon:** Supervision, Data curation, Investigation, Writing – original draft. **Emmanuelle Fiore:** Methodology, Investigation. **Patrice Faure:** Supervision, Writing – review & editing. **Corinne Ravelet:** Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing. **Eric Peyrin:** Conceptualization, Project administration, Supervision, Funding acquisition, Writing – review & editing.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114091>.

## References

- Atherton, S.J., Beaumont, P.C.J., 1986. *Phys. Chem.* 90, 2252–2259.
- Billet, B., Chovelon, B., Fiore, E., Oukacine, F., Petrillo, M.-A., Faure, P., Ravelet, C., Peyrin, E., 2021. *Angew. Chem. Int. Ed.* 60, 12346–12350.
- Birch, D.J.S., Suhling, K., Holmes, A.S., Salthammer, T., Imhof, R.E., 1993. *Pure Appl. Chem.* 65, 1687–1692.
- Bregadze, V., Khutsishvili, I., Chkhaberidze, J., Sologhashvili, K., 2002. *Inorg. Chim. Acta.* 339, 145–159.
- 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., 2016. *Anal. Chem.* 88, 11963–11971.
- Chang, H., Tang, L., Wang, Y., Jiang, J., Li, 2010. *J. Anal. Chem.* 82, 2341–2346.
- Doose, S., Neuweiler, H., Sauer, M., 2009. *ChemPhysChem* 10, 1389–1398.
- Draper, D.E., 2004. *RNA* 10, 335–343.
- Durand, G., Lisi, S., Ravelet, C., Dausse, E., Peyrin, E., Toulmé, J., 2014. *J. Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 6942–6945.
- Eichhorn, G.L., Shin, Y.A., 1968. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 7323–7328.
- Fan, Y.Y., Li, J., Fan, L., Wen, J., Zhang, J., Zhang, Z.-Q., 2021. *Sensor. Actuator. B Chem.* 346, 130561.
- Gulbakan, D., Barylyuk, K., Schneider, P., Pillong, M., Schneider, G., Zenobi, R., 2018. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 7486–7497.
- Hackl, E.V., Kornilova, S.V., Blagoi, Y.P., 2005. *Int. J. Biol. Macromol.* 35, 175–191.
- Holmstrom, E.D., Polaski, J.T., Batey, R.T., Nesbitt, D.J., 2014. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 16832–16843.
- Jahnke, K., Grubmuller, H., Igaev, M., Gopfrich, K., 2021. *Nucleic Acids Res.* 49, 4186–4195.
- Jhaveri, S.D., Kirby, R., Conrad, R., Maglott, E.J., Bowser, M., Kennedy, R.T., Glick, G., Ellington, A.D., 2000. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 2469–2473.
- Kahyaoglu, L.N., Rickus, J.L., 2018. *Langmuir* 34 (48), 14586–14596.
- Kazakov, S.A., Hecht, S.M., 2006. *Nucleic Acid-Metal Ion Interactions*, Encyclopedia of Inorganic Chemistry. John Wiley & Sons, Ltd.
- Keller, K.M., Breeden, M.M., Zhang, J., Ellington, A., Brodbelt, J.S., 2005. *J. Mass Spectrom.* 40, 1327–1337.
- Kemlo, J.A., Shepherd, T.M., 1977. *Chem. Phys. Lett.* 47, 158–162.
- Li, W., Zhang, Z., Zhou, W., Liu, J., 2017. *ACS Sens.* 2, 663–669.
- Liu, Z., Liu, B., Ding, J., Liu, J., 2014. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 6885–6902.
- Lopez, A., Liu, J., 2021. *Anal. Chem.* 93, 3018–3025.
- Ma, H., Li, W., Zhou, W., Liu, J., 2017. *ChemPlusChem* 82, 1224–1230.
- Marchand, A., Granzhan, A., Iida, K., Tsushima, Y., Ma, Y., Nagasawa, K., Teulade-Fichou, M.-P., Gabelica, V., 2015. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 750–756.
- Mei, M., Mu, L., Liang, S., Wang, Y., She, G., Shi, W., 2021. *Biosens. Bioelectron.* 178, 113025.
- Merino, E.J., Weeks, K.M., 2005. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 12766–12767.
- Mikkelsen, N.E., Johansson, K., Virtanen, A., Kirsebom, L.A., 2001. *Nat. Struct. Biol.* 8, 510–514.
- Ngororabanga, J.M.V., Moyo, C., Hosten, E., Mama, N., Tshentu, Z.R., 2019. *Anal. Methods* 11, 3857–3865.
- Nutiu, R., Li, Y., 2003. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 4771–4778.
- Reuss, A.J., Vogel, M., Weigand, J.E., Suess, B., Wachtveitl, J., 2014. *Biophys. J.* 107, 2962–2971.
- Ruppich, N., Chiuman, W., Nutiu, R., Mei, S., Flora, K.K., Li, Y., Brennan, J.D., 2006. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 780–790.
- Sissoeff, I., Grisvard, J., Guillé, E., 1976. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 31, 165–199.
- Sorokin, D.A., Valeev, V.A., Gladchenko, G.O., Degtiar, M.V., Blagoi, Y.P., 2001. *Macromol. Biosci.* 1, 191–203.
- Stojanovic, M.N., de Prada, P., Landry, D.W., 2001. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 4928–4931.
- Tan, Z., Feagin, T.A., Heemstra, J.M., 2016. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 6328–6331.
- Ueno, Y., 2021. *Anal. Sci.* 37, 439–446.
- Unruh, J.R., Gokulrangan, G., Wilson, G.S., Johnson, C.K., 2005a. *Photochem. Photobiol.* 81, 682–690.
- Unruh, J.R., Gokulrangan, G., Lushington, G.H., Johnson, C.K., Wilson, G.S., 2005b. *Biophys. J.* 88, 3455–3465.
- Varnes, A.W., Dodson, R.B., Wehry, E.L., 1972. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 946–950.
- Wang, R.E., Zhang, Y., Cai, J., Cai, W., Gao, T., 2011. *Curr. Med. Chem.* 18, 4175–4184.
- Xia, T., Yuan, J., Fang, X.J., 2013. *Phys. Chem. B* 117 (48), 14994–15003.
- Yu, X., Wu, X., Bermejo, G.A., Brooks, B.R., Taraska, J.W., 2013. *Structure* 21, 9–19.
- Zhang, D., Shen, H., Li, G., Zhao, B., Yu, A., Zhao, Q., Wang, H., 2012. *Anal. Chem.* 84, 8088–8094.
- Zhao, Q., Lv, Q., Wang, H., 2014. *Anal. Chem.* 86, 1238–1245.
- Zhou, X.H., Kong, D.M., Shen, H.X., 2010. *Anal. Chem.* 82, 789–793.
- Zimmermann, G.R., Wick, C.L., Shields, T.P., Jenison, R.D., Pardi, A., 2000. *RNA* 6, 659–667.

# SUPPLEMENTARY DATA

## Detection of Small Molecules by Fluorescence Intensity using Single Dye Labeled Aptamers and Quencher Transition Metal Ions

Blandine Billet,<sup>1,2</sup> Benoit Chovelon,<sup>1,2</sup> Emmanuelle Fiore,<sup>1</sup> Patrice Faure,<sup>1,2</sup> Corinne Ravelet,<sup>1\*</sup> and Eric Peyrin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>University Grenoble Alpes, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble; CNRS, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France

<sup>2</sup>Biochemistry, Toxicology and Pharmacology Department, Grenoble site Nord CHU– Biology and Pathology Institute, F-38041 Grenoble, France

### Table of Contents

<b>Table S1.</b> List of DNA probes	(S2)
<b>Table S2.</b> Apparent $K_d$ for different target-probe complexes and fitting procedure	(S3)
<b>Figure S1.</b> Comparison of FI response for free dyes and apt-T conjugates	(S4)
<b>Figure S2.</b> Responsivity of 3'-TR-apt-T and 3'-F-apt-T in fluorescence anisotropy	(S5)
<b>Figure S3.</b> Effects of label position and aptamer length on the probe responsivity for the L-Tym system	(S6)
<b>Figure S4.</b> Dose-response curves of 3'-TR-apt-T and 5'-TR-apt-A in the absence of metal ions	(S7)
<b>Figure S5.</b> $\text{Na}^+$ and $\text{Mg}^{2+}$ effects on the probe responsivity for the L-Tym system	(S8)
<b>Figure S6.</b> Linear range for the developed sensors	(S9)
<b>Figure S7.</b> Responsivity of 5'-TR-apt-A and 5'-F-apt-A in fluorescence anisotropy	(S10)
<b>Figure S8.</b> Effects of label position on the probe responsivity for the Ade system	(S11)
<b>Figure S9.</b> Responsivity of the TR and F conjugates for the Coc system	(S12)
<b>Figure S10.</b> Sensing of Coc using 5'-TR-apt-C and $\text{Ni}^{2+}$ quencher	(S13)
<b>Figure S11.</b> Analysis of diluted human urine samples spiked with Ade and kinetic results	(S14)
<b>References</b>	(S15)

**Table S1.** List of DNA probes used in this work (F: fluorescein; TR: Texas-Red).

Name	5' → 3'
<b>3'-F-apt-T</b>	TGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCCC-F
<b>5'-F-apt-T</b>	F-TGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCCC
<b>3'-TR-apt-T</b>	TGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCCC-TR
<b>5'-TR-apt-T</b>	TR-TGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCCC
<b>5'-TR-apt-T-L</b>	TR-TGGAGCTTGGATTGATGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCCC
<b>3'-F-apt-A</b>	CCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGG-F
<b>5'-F-apt-A</b>	F-CCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGG
<b>3'-TR-apt-A</b>	CCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGG-TR
<b>5'-TR-apt-A</b>	TR-CCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGG
<b>3'-F-apt-C</b>	GACAAGGAAAATCCTTCAATGAAGTGGGTC-F
<b>5'-F-apt-C</b>	F-GACAAGGAAAATCCTTCAATGAAGTGGGTC
<b>3'-TR-apt-C</b>	GACAAGGAAAATCCTTCAATGAAGTGGGTC-TR
<b>5'-TR-apt-C</b>	TR-GACAAGGAAAATCCTTCAATGAAGTGGGTC

**Table S2.** Apparent  $K_d$  values for different complexes determined from the dose-response curves of TR conjugates in the presence of  $Ni^{2+}$  and/or  $Co^{2+}$ .

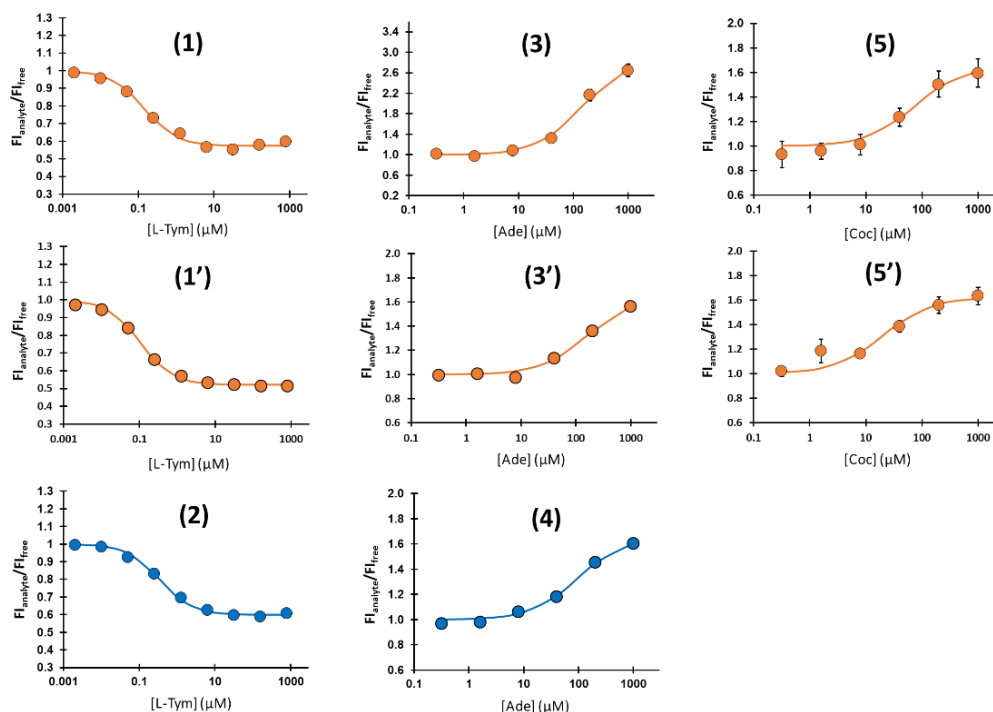
Systems	$K_d^{app}$ ( $\mu M$ )*
(1) L-Tym/3'-TR-apt-T/ $Ni^{2+}$ (4 $\mu M$ )	$0.13 \pm 0.01$
(1') L-Tym/5'-TR-apt-T/ $Ni^{2+}$ (4 $\mu M$ )	$0.09 \pm 0.01$
(2) L-Tym/3'-TR-apt-T/ $Co^{2+}$ (4 $\mu M$ )	$0.34 \pm 0.04$
(3) Ade/5'-TR-apt-A/ $Ni^{2+}$ (40 $\mu M$ )	$155 \pm 15$
(3') Ade/3'-TR-apt-A/ $Ni^{2+}$ (40 $\mu M$ )	$173 \pm 21$
(4) Ade/5'-TR-apt-A/ $Co^{2+}$ (400 $\mu M$ )	$105 \pm 35$
(5) Coc/5'-TR-apt-C/ $Ni^{2+}$ (400 $\mu M$ )	$74 \pm 21$
(5') Coc/3'-TR-apt-C/ $Ni^{2+}$ (400 $\mu M$ )	$24 \pm 13$

\*The fitting procedure was performed with the Excel Solver algorithm (least squared method) by modelling each dose-response curve from three independent experiments through the following equation:

$$\frac{FI_{analyte}}{FI_{free}} = S = 1 + \frac{\Delta S_{max}}{1 + \left( \frac{K_d^{app}}{c_{analyte}} \right)}$$

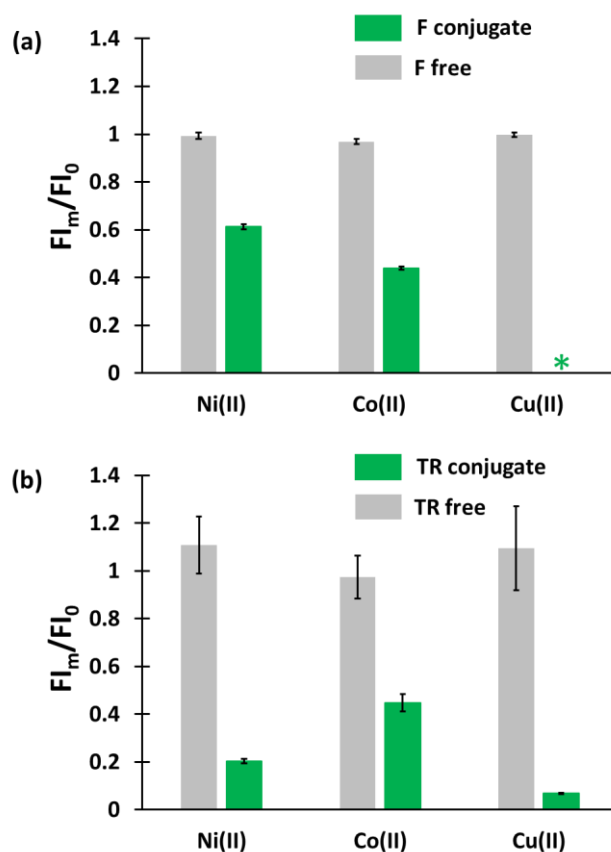
where  $FI_{analyte}$  and  $FI_{free}$  are the fluorescence intensity in the presence and absence of analyte, respectively,  $S$  is the corresponding normalized FI signal,  $\Delta S_{max}$  is the maximal change of the normalized FI signal (positive or negative, depending on the increase or decrease in the sensor response, respectively),  $K_d^{app}$  is the apparent dissociation constant, and  $c_{analyte}$  is the total concentration of target. Under the conditions of probe concentration, *i. e.*  $0.03 \mu M \leq K_d^{app}/5$ , the total concentration of target can closely approximate its free concentration. For the L-Tym/TR-apt-T/ $Ni^{2+}$  systems, the validity conditions are not fully satisfied so that we used the non-simplified model (Challier et al., 2016) to estimate the  $K_d^{app}$  values.

The corresponding fitting curves for the eight systems (Table S2) are as follows:

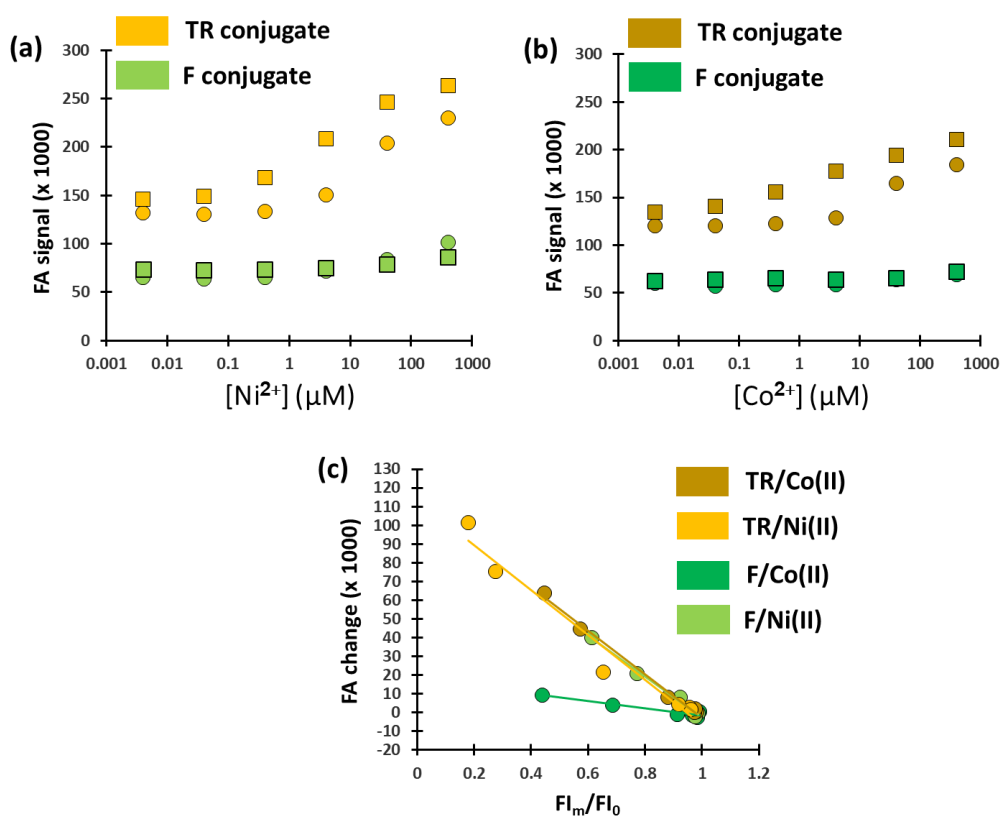


[See captions of Figures 4, 6 and S10 for the experimental conditions]

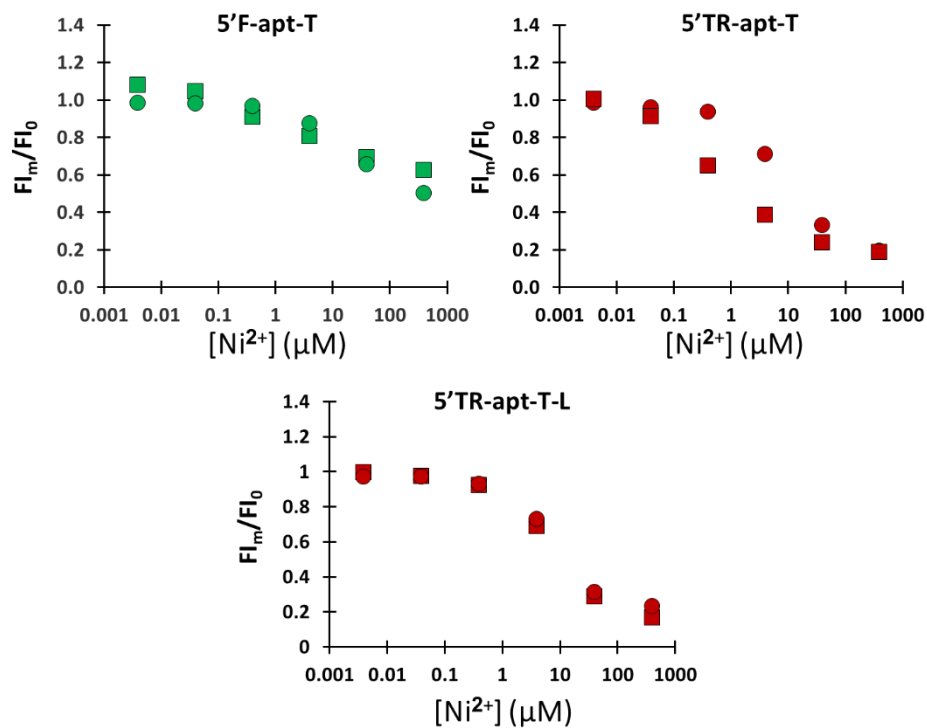
**Figure S1.** Effects of metal ions (400  $\mu\text{M}$ ) on the response of the (a) free F dye and 3'-F-apt-T conjugate, and (b) free TR dye and 3'-TR-apt-T conjugate (30 nM). 50mM MES buffer.  $FI_m$  and  $FI_0$  are the fluorescence intensity in the presence and absence of metal ions, respectively (<sup>\*</sup> a nearly complete quenching was recorded for 3'-F-apt-T with  $\text{Cu}^{2+}$ ). Error bars represent the standard deviation from three independent experiments.



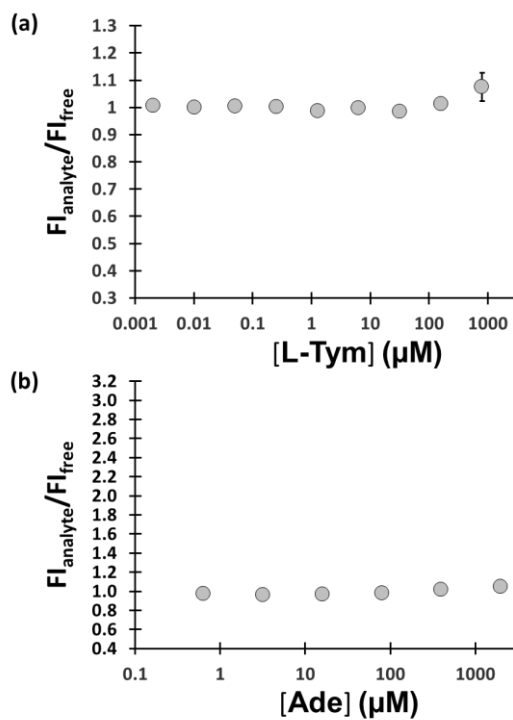
**Figure S2.** (a)  $\text{Ni}^{2+}$  and (b)  $\text{Co}^{2+}$  titration of the 3'-TR-apt-T and 3'-F-apt-T probes in the absence (circle) and presence (square) of L-Tym (1 mM) recorded by fluorescence anisotropy. (c) FA change ( $\text{FA}_m - \text{FA}_0$ ) plotted against the corresponding variation in the normalized FI signal for the target-free probes. The solid line represents linear fit to the data ( $R^2$  value ranges from 0.94 to 0.99 depending on the conjugates and metal ions).  $\text{FA}_m$  and  $\text{FA}_0$  are the fluorescence anisotropy in the presence and absence of metal ions, respectively.  $\text{FI}_m$  and  $\text{FI}_0$  are the fluorescence intensity in the presence and absence of metal ions, respectively. 50 mM MES buffer. Error bars represent the standard deviation from three independent experiments.



**Figure S3.**  $\text{Ni}^{2+}$  titration of the 5'-F-apt-T, 5'-TR-apt-T and 5'-TR-apt-T-L (longer version) probes in the absence (circle) and presence (square) of L-Tym (1 mM). 50 mM MES buffer.  $\text{FI}_m$  and  $\text{FI}_0$  are the fluorescence intensity in the presence and absence of  $\text{Ni}^{2+}$ , respectively. Error bars represent the standard deviation from three independent experiments.

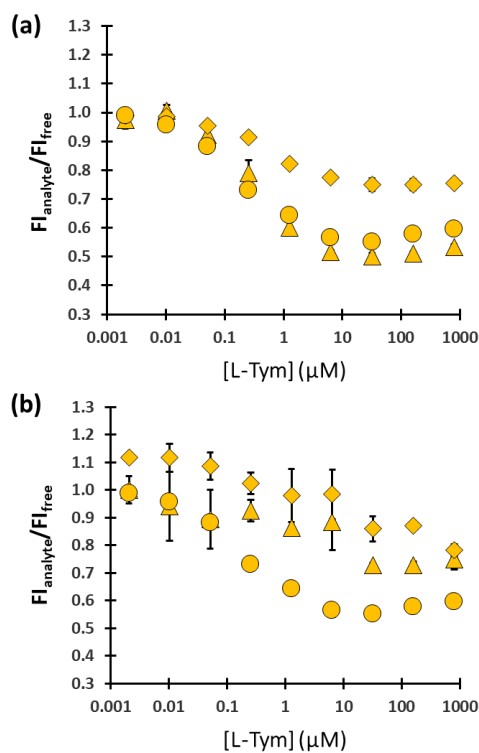


**Figure S4.** Dose-response curves, in the absence of transition metal ions, of the (a) 3'-TR-apt-T and (b) 5'-TR-apt-A probes for the L-Tym and Ade analytes, respectively. 50 mM MES buffer.  $FI_{\text{analyte}}$  and  $FI_{\text{free}}$  are the fluorescence intensity in the presence and absence of analyte, respectively. For an accurate comparison, the scales of signal variation are identical to those shown in Figures 4 and 6. Error bars represent the standard deviation from three independent experiments.

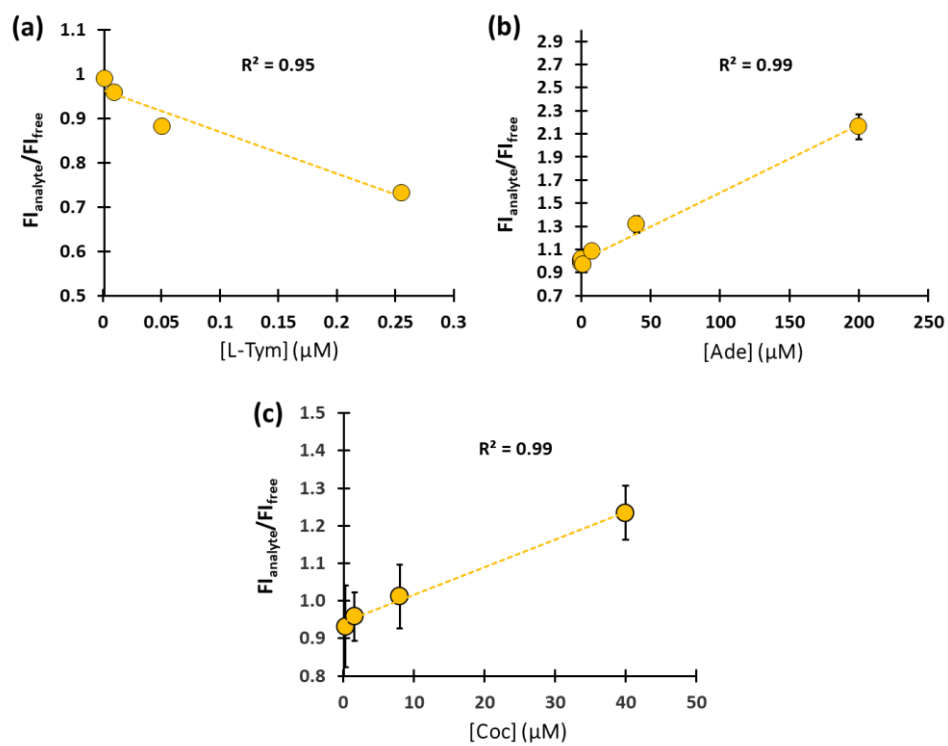




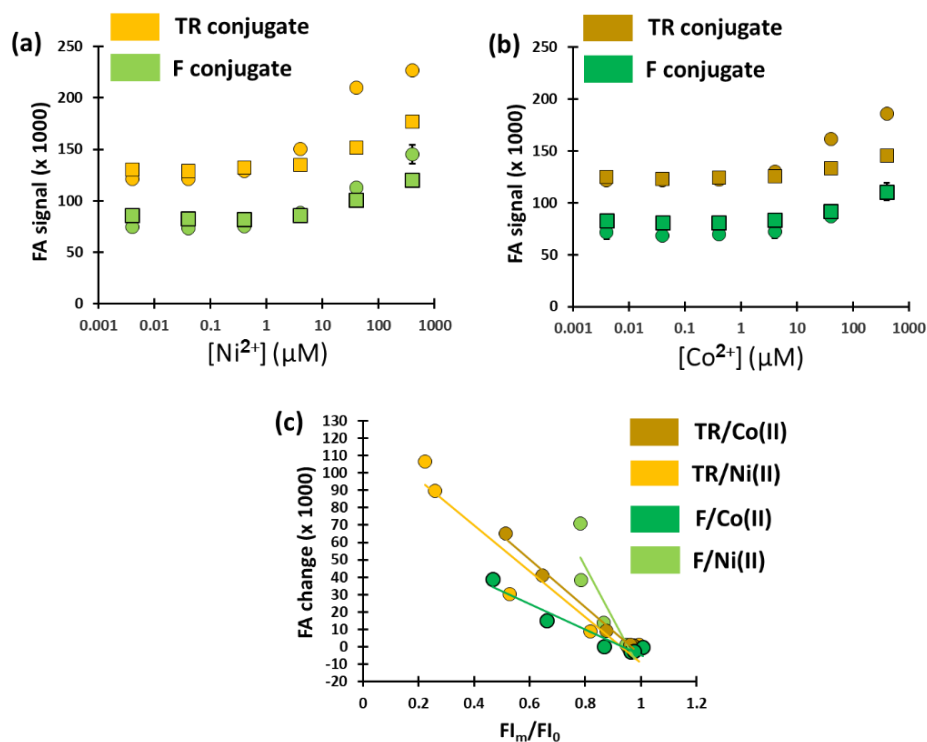
**Figure S5.** Dose-response curves of the 3'-TR-apt-T probe ( $4 \mu\text{M Ni}^{2+}$ ) as a function of the concentration of (a)  $\text{Na}^+$  or (b)  $\text{Mg}^{2+}$  in the reaction medium. (a) The MES buffer concentration was 50 (circle), 100 (triangle) and 500 (diamond) mM, corresponding to  $[\text{Na}^+]$  varying from  $\sim 30$  to  $\sim 300$  mM. (b) The  $\text{Mg}^{2+}$  concentration was 0 (circle), 0.5 (triangle) and 5 (diamond) mM, in 50 mM MES buffer.  $\text{FI}_{\text{analyte}}$  and  $\text{FI}_{\text{free}}$  are the fluorescence intensity in the presence and absence of analyte, respectively. Error bars represent the standard deviation from three independent experiments.



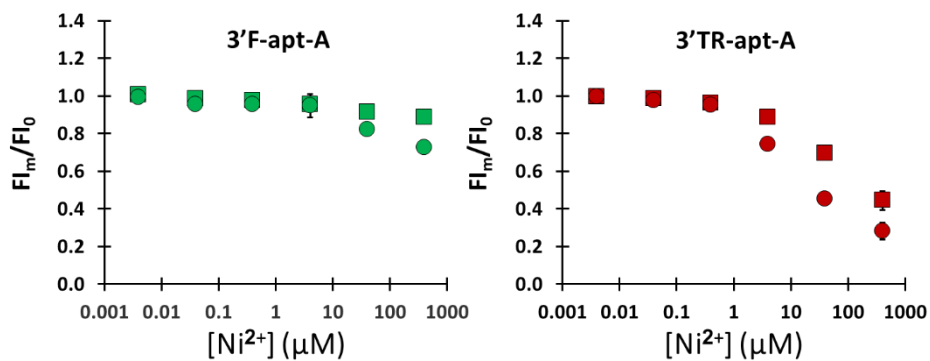
**Figure S6.** Linear range for the sensors involving the (a) L-Tym/3'-TR-apt-T/Ni<sup>2+</sup> (4  $\mu$ M), (b) Ade/5'-TR-apt-A/Ni<sup>2+</sup> (40  $\mu$ M) and (c) Coc/5'-TR-apt-C/Ni<sup>2+</sup> (400  $\mu$ M) systems. 50 mM MES buffer. FI<sub>analyte</sub> and FI<sub>free</sub> are the fluorescence intensity in the presence and absence of analyte, respectively. Error bars represent the standard deviation from three independent experiments.



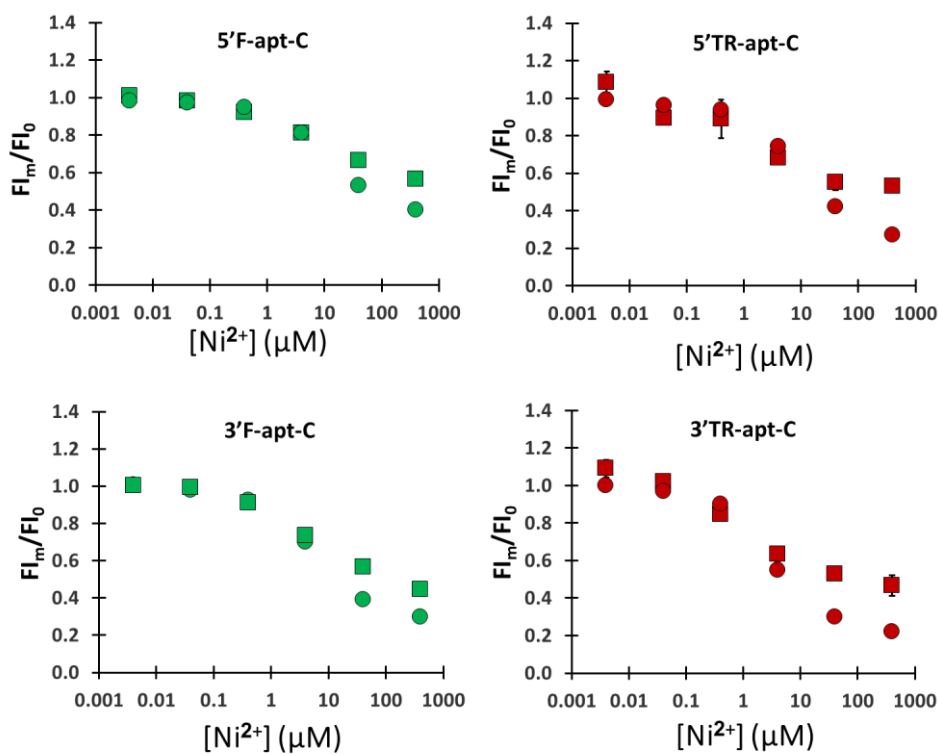
**Figure S7.** (a)  $\text{Ni}^{2+}$  and (b)  $\text{Co}^{2+}$  titration of the 5'-TR-apt-A and 5'-F-apt-A probes in the absence (circle) and presence (square) of Ade (1 mM) recorded by fluorescence anisotropy. The FA change ( $\text{FA}_m - \text{FA}_0$ ) of the target-free probes ranged from 0.060 to 0.105 and from 0.040 to 0.070 for the TR and F conjugates, respectively. (c) FA change plotted against the corresponding variation in the normalized FI signal for the target-free probes. The solid line represents linear fit to the data ( $R^2$  value ranges from 0.82 to 0.99 depending on the conjugates and metal ions).  $\text{FA}_m$  and  $\text{FA}_0$  are the fluorescence anisotropy in the presence and absence of metal ions, respectively.  $\text{FI}_m$  and  $\text{FI}_0$  are the fluorescence intensity in the presence and absence of metal ions, respectively. 50 mM MES buffer. Error bars represent the standard deviation from three independent experiments.



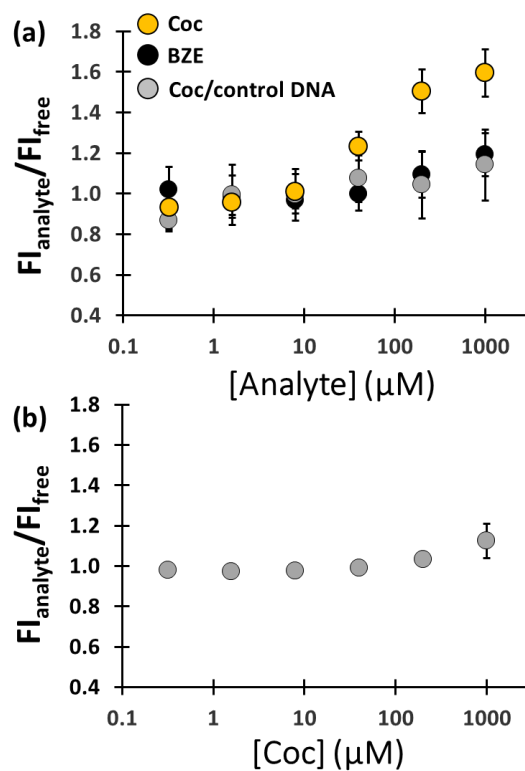
**Figure S8.**  $\text{Ni}^{2+}$  titration of the 3'-F-apt-A and 3'-TR-apt-A probes in the absence (circle) and presence (square) of Ade (1 mM). Although the Ade-dependent response recorded with 3'-TR-apt-A is not as high as that of 5'-TR-apt-A (see Figure 5), it remains better than that observed with the corresponding F-conjugate. 50 mM MES buffer.  $\text{FI}_m$  and  $\text{FI}_0$  are the fluorescence intensity in the presence and absence of  $\text{Ni}^{2+}$ , respectively. Error bars represent the standard deviation from three independent experiments.



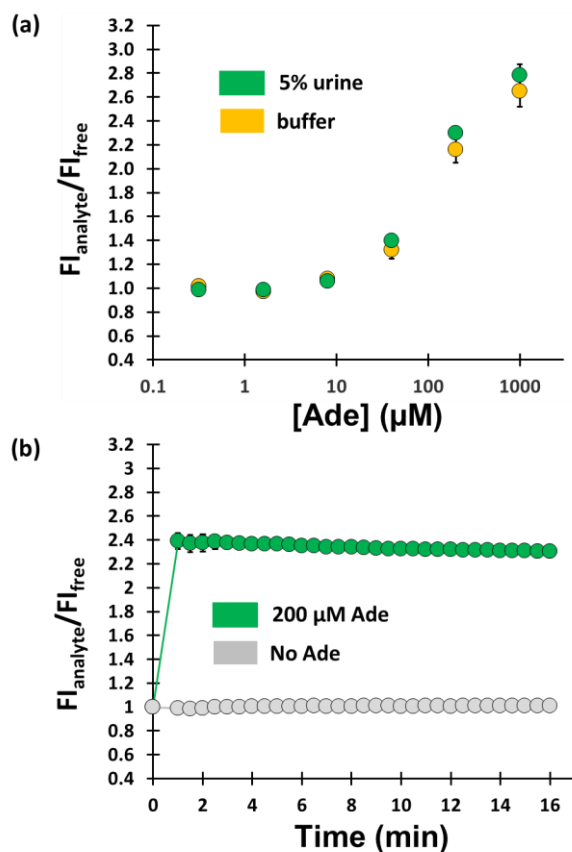
**Figure S9.**  $\text{Ni}^{2+}$  titration of the TR and F conjugates of apt-C in the absence (circle) and presence (square) of Coc (1 mM). The shift in the titration curve of TR conjugates upon Coc binding was somewhat different from that of the Ade system (see Figures 5 and S8) as it only occurred at high concentration of the metal ion. Under these optimal  $\text{Ni}^{2+}$  conditions, the TR probes reacted to the presence of Coc with a better magnitude than the F conjugates. The terminal position of the reporters was shown to have no significant effects on the FI signaling. 50 mM MES buffer.  $\text{FI}_m$  and  $\text{FI}_0$  are the fluorescence intensity in the presence and absence of  $\text{Ni}^{2+}$ , respectively. Error bars represent the standard deviation from three independent experiments.



**Figure S10. (a)** Dose-response curves of the 5'-TR-apt-C and control DNA (3'-TR-apt-T) probes for Coc or non-cognate compound (BZE), in the presence of 400  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$ . **(b)** Dose-response curve of 5'-TR-apt-C in the absence of  $\text{Ni}^{2+}$ . A slight FI enhancement ( $\sim 15\%$ ) was found at 1 mM Coc. 50 mM MES buffer.  $\text{FI}_{\text{analyte}}$  and  $\text{FI}_{\text{free}}$  are the fluorescence intensity in the presence and absence of analyte, respectively. Error bars represent the standard deviation from three independent experiments.



**Figure S11.** (a) FI change of 5'-TR-apt-A as a function of the Ade concentration for spiked samples in either 50mM MES buffer (see also Figure 6) or 50 mM MES buffer containing 5% human urine, in the presence of 40  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$ . Since the urinary concentration of endogenous Ade or related apt-A-binding compound ATP is in the low-micromolar (Rajasekeran et al., 2017) or nanomolar (Chen et al., 2020) range, respectively, the signal in the diluted matrix sample can be considered to come from the added target. (b) Real-time monitoring of Ade (200  $\mu\text{M}$ ) in 50 mM MES buffer containing 5% human urine, in the presence of 40  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$ . A blank experiment (no Ade added to the sample) was also performed for comparison. The FI signal was recorded at a regular time interval of 30 s after the first measurement (~1 min). Error bars represent the standard deviation from three independent experiments.



## References

Challier, L., et al. *Anal. Chem.* 2016, 88, 11963-11971.

Chen, Z., et al. *Transl. Androl. Urol.* 2020, 9, 284-294.

Rajasekeran, H., et al. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2017, 313, F184–F191.

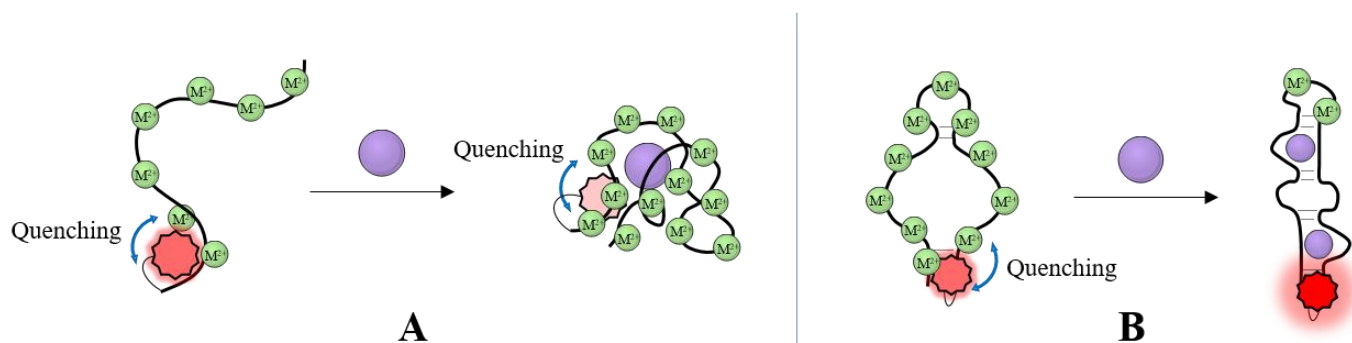


## Discussion et conclusion

Parmi les trois ions métalliques quenchers testés, seuls  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Co}^{2+}$  ont été retenus. En effet, selon la classification HSAB (Figure 10), l'ion  $\text{Cu}^{2+}$  a un impact significatif sur la structure de l'aptamère en raison de son affinité importante envers les bases nucléiques, ce qui le rend difficile à déplacer même en présence de la cible.

L'ajout de L-tyrosinamide est accompagné d'une intensification du quenching du Texas Red, indiquant une fixation accrue des cations métalliques sur l'aptamère. Cela se traduit par une amélioration considérable du  $K_d$  apparent de l'aptamère pour sa cible d'un facteur compris entre 30 et 75 ( $0,13\text{-}0,34 \mu\text{M}$  *versus*  $10 \mu\text{M}$ ), témoignant ainsi d'une stabilisation du complexe aptamère-cible. Par ailleurs, nous avons noté une détérioration du processus de quenching en présence d'ions  $\text{Mg}^{2+}$ , avec une réduction du signal maximal associée à un décalage de la courbe vers des concentrations en cible plus élevées, probablement en raison d'une compétition avec les ions quenchers pour l'accès à l'ADN. Cette observation contraste avec les résultats du travail précédent dans lequel les ions  $\text{Mg}^{2+}$  jouaient un rôle important dans l'optimisation du capteur, principalement sur l'affinité de l'aptamère pour la L-tyrosinamide.

Concernant l'adénosine, le phénomène opposé se produit lors de sa reconnaissance par l'aptamère. Une augmentation de l'intensité de fluorescence faisant suite au déplacement des ions quenchers est constatée. Ces mécanismes distincts entre les deux cibles testées semblent être influencés par le type de structure secondaire adoptée par l'aptamère utilisé, ainsi que par les caractéristiques de complexation aptamère-cible. La structure secondaire de l'aptamère anti-L-tyrosinamide, qui reste inconnue à ce jour, pourrait promouvoir l'exposition de sites spécifiques supplémentaires pour la fixation d'ions quenchers, ou encore faciliter le rapprochement entre le Texas Red et des ions quenchers non déplacés grâce à des repliements bien précis. Quant à l'aptamère anti-adénosine, il est établi que sa structure à l'état libre contient une boucle interne, qui forme par la suite deux poches de liaison lors de la reconnaissance de sa cible. Cette modification structurelle favoriserait ainsi le déplacement des ions quenchers en faveur de la liaison de l'adénosine. Une représentation schématique de ces mécanismes appliquée à ces deux systèmes est proposée dans la Figure 39.



**Figure 39.** Représentation schématique de la méthode de quenching du Texas Red par des ions métalliques de transition en fonction de la structure secondaire de l'aptamère anti-L-tyrosinamide (**A**, hypothétique) et de l'aptamère anti-adénosine (**B**).

D'un point de vue conceptuel, nous avons d'une part un système qui se comporte de manière similaire à ce qui a été décrit dans la publication précédente avec les ions  $Pb^{2+}$  ou  $Cd^{2+}$ , à la différence que le signal de transduction est différent. L'autre système, bien qu'utilisant le même aptamère anti-L-tyrosinamide que précédemment, parvient à stabiliser sa structure en présence de  $Ni^{2+}$  ou  $Co^{2+}$  spécifiquement. Cela met en évidence l'impact du choix de l'ion métallique sur la modification de signal observée.

Notre méthode a permis de détecter la L-tyrosinamide et l'adénosine avec des limites de détection respectives de 10 nM et 8  $\mu$ M en utilisant l'ion  $Ni^{2+}$  comme transducteur. Nous avons également étudié une troisième cible, la cocaïne, dont le mécanisme de signalisation semble être similaire à celui observé pour l'adénosine. Une réponse d'intensité modérée ainsi qu'une limite de détection plus élevée, de l'ordre de 30  $\mu$ M, ont cependant été constatées, pouvant être attribuées à la structure secondaire radicalement différente de cet aptamère par rapport à celui dirigé contre l'adénosine. Les tests de spécificité et les essais en format direct ont été réalisés de manière similaire au travail précédent et ont produit des résultats concluants. Nous avons également pu évaluer favorablement la possibilité d'appliquer cette méthode en milieu complexe pour l'adénosine, en utilisant une matrice comprenant 5% d'urine. Des expériences cinétiques effectuées directement dans cette matrice ont mis en évidence une réaction rapide inférieure à une minute.

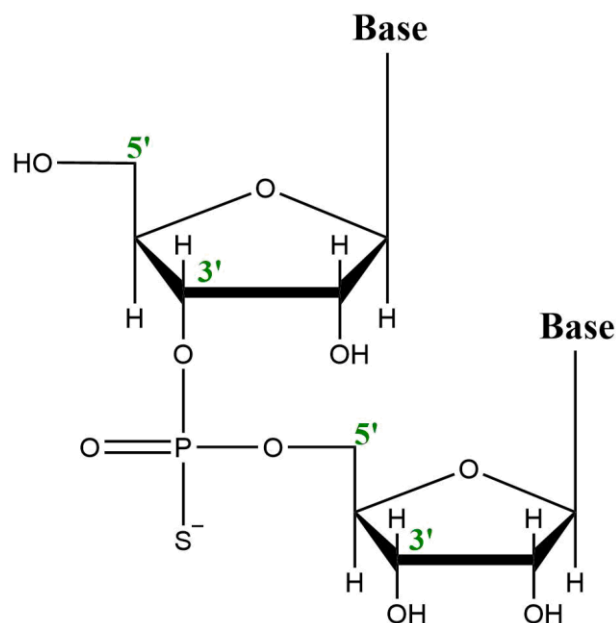
Tout comme le capteur précédent, celui-ci présente les avantages d'une simplicité de conception, d'une acquisition rapide du signal et d'un coût abordable. Cette méthode de transduction est inédite puisqu'habituellement, les propriétés de quenching des ions métalliques sont généralement considérées comme des inconvénients lors du développement d'aptacapteurs basés sur la fluorescence. Les limites liées à la liaison aléatoire des ions métalliques, déjà évoquées, sont également présentes dans cette approche. La structure secondaire de l'aptamère semble également exercer un rôle significatif dans le mécanisme de signalisation et dans l'amplitude de la réponse obtenue. Par exemple, certaines structures secondaires comme le « three-way junction » produisent un signal modéré. Néanmoins, ce travail a mis en lumière la possibilité d'exploiter des ions alternatifs aux espèces alcalino-terreuses habituellement utilisées pour stabiliser certains complexes aptamère-cible.

### 3. Utilisation d'ions métalliques de moindre toxicité *via* l'emploi d'aptamères modifiés (PS aptamères).

#### Contexte et stratégie :

Notre premier aptacapteur présente l'inconvénient d'être opérationnel uniquement en présence d'ions  $Pb^{2+}$  ou d'ions  $Cd^{2+}$ . Grâce au développement du second aptacapteur, notre méthode générale de commutation médiée par les ions métalliques a pu inclure l'utilisation d'autres cations tels que  $Ni^{2+}$  et  $Co^{2+}$ . Néanmoins, une manipulation prudente de ces éléments est indispensable en raison de leur toxicité pour l'organisme humain et l'environnement.<sup>281-284</sup> De ce fait, nous avons entrepris la recherche d'approches alternatives faisant appel à des ions métalliques moins toxiques.

Notre intérêt s'est ainsi porté vers l'emploi d'aptamères comportant des liaisons phosphorothioate (PS), où un atome d'oxygène du groupement phosphate est remplacé par un atome de soufre (Figure 40). Principalement utilisées pour améliorer l'affinité d'un aptamère envers sa cible ou pour augmenter sa résistance *in vivo* aux nucléases,<sup>285</sup> les liaisons PS présentent également la particularité de modifier l'affinité de liaison des ions métalliques par rapport à une liaison phosphodiester classique. En effet, les ions métalliques « soft » et « borderline » présentent une affinité de liaison supérieure vis-à-vis de l'atome de soufre par rapport aux atomes d'oxygène.<sup>6,286</sup> Par conséquent, nous prévoyons un décalage dans la classification HSAB, conduisant à une augmentation de l'affinité d'ions « borderline » tels que  $Zn^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ , qui présentent tous deux une toxicité moins importante comparativement aux autres éléments susmentionnés.<sup>287,288</sup>



**Figure 40.** Représentation de deux nucléotides reliés par une liaison phosphorothioate.

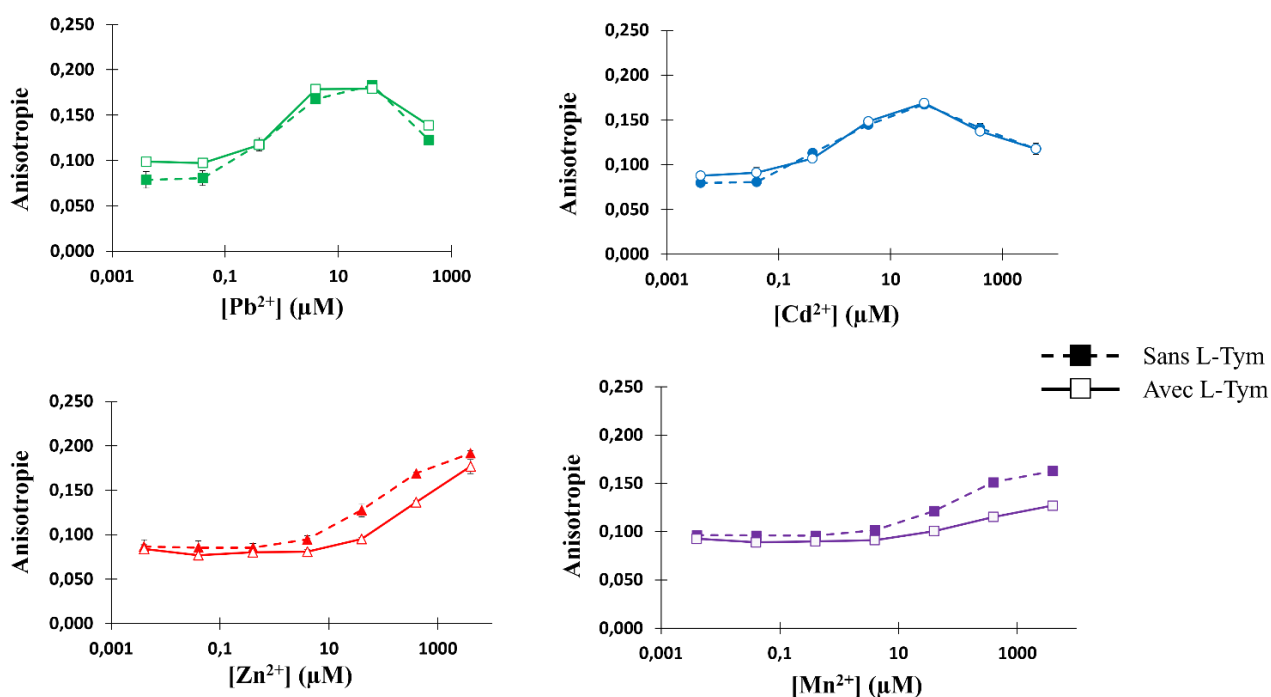
### Matériel et méthodes :

Les réactifs utilisés dans ce travail sont les mêmes que ceux mentionnés dans la publication n°1 (Supporting Information, Experimental Procedures, section A), à l'exception des séquences d'aptamères, dont toutes les liaisons phosphodiester ont été remplacées par des liaisons PS.

Les protocoles expérimentaux concernant le titrage des aptamères par les ions métalliques ainsi que la réalisation de courbes dose-réponse avec la cible sont similaires à ceux décrits dans la publication n°1 (Supporting Information, Experimental Procedures, sections D.a et D.b), à l'exception de la concentration finale en aptamère, qui est de 100 nM, et du tampon de liaison utilisé, dont la composition est de 10 mM de MES (acide-2-éthanosulfonique) pH 6.3, sans ajout de MgCl<sub>2</sub>.

## Résultats et discussion :

Afin de vérifier nos hypothèses, cette approche a été évaluée en utilisant la L-tyrosinamide comme cible modèle. Nous avons examiné l'impact exercé par les ions  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  sur la modification du signal en anisotropie de fluorescence. Nous avons employé une séquence 23mer, marquée avec la fluorescéine et comportant 22 liaisons PS (3'F-PS-apt-T). Les résultats de titrage de l'aptamère en présence et en absence de L-Tym sont présentés dans la Figure 41. Aucune différence de signal significative n'a été observée pour  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$ , ce qui suggère deux hypothèses possibles : soit la cible n'est pas reconnue en raison de la substitution de toutes les liaisons phosphodiester, soit ces ions possèdent une forte affinité avec l'aptamère, similaire à celle observée avec les ions « soft », ce qui les rend difficilement déplaçables lors de l'ajout de la cible. Par la suite, nous avons constaté une différence modérée mais significative de l'anisotropie pour les ions  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$ , avec des valeurs respectives de 0,033 à 40  $\mu\text{M}$  et de 0,036 à 400  $\mu\text{M}$ , ce qui appuie notre deuxième hypothèse.



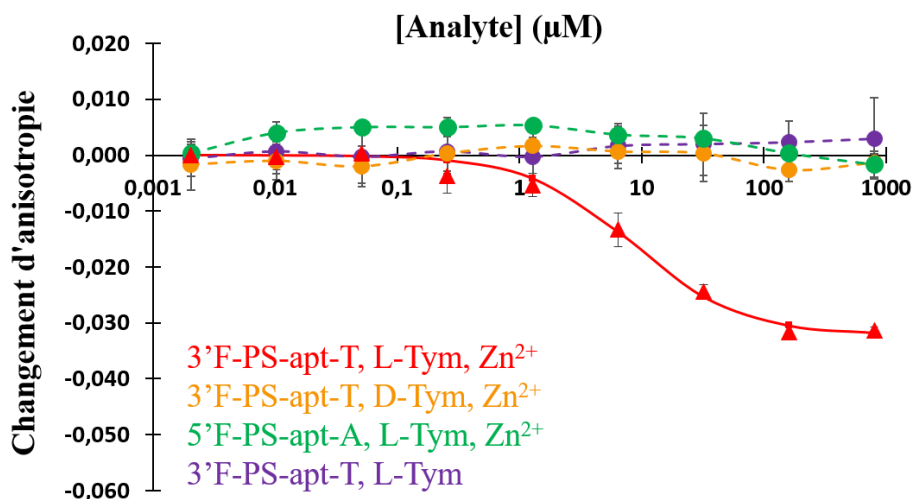
**Figure 41.** Anisotropie de fluorescence de l'aptamère 3'F-PS-apt-T, en fonction de la concentration en ion métallique, en absence ou en présence de 1 mM de L-Tym. Conditions : 10 mM de tampon MES, 0 mM de  $\text{MgCl}_2$ , pH 6.3, température ambiante.

Les valeurs de  $K_d$  apparents correspondant à l'interaction entre l'aptamère et les ions métalliques étudiés ont été déterminées de manière similaire à la publication n°1. Les résultats de ces calculs sont répertoriés dans le Tableau 9 ci-dessous. Nous pouvons ainsi observer une nette diminution des  $K_d$  apparents par rapport à ceux mesurés pour l'aptamère non modifié dans la publication n°1 (voir Figure 2a). Ces données attestent d'une augmentation significative de l'affinité de ces ions métalliques envers l'aptamère modifié, consolidant l'hypothèse précédemment avancée. Cette observation confirme ainsi le changement notable dans la classification HSAB, où les ions  $Pb^{2+}$  et  $Cd^{2+}$  montrent désormais une affinité proche de celle des ions « soft » tels que  $Hg^{2+}$ , tandis que les ions  $Zn^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  présentent une affinité améliorée respectivement d'un facteur 3,6 et 10.

**Tableau 9.** Mesures de  $K_d$  apparents ( $K_d^{app}$ ) entre les aptamères 3'F-PS-apt-Tym et 3'F-apt-Tym et les ions métalliques  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  et  $Mn^{2+}$ .

Ion métallique	$K_d^{app}$ 3'F-PS-apt-Tym ( $\mu M$ )	$K_d^{app}$ 3'F-apt-Tym ( $\mu M$ ) (Cf. Publication n°1)
$Pb^{2+}$	$0.8 \pm 0.2$	$14 \pm 1$
$Cd^{2+}$	$1.1 \pm 0.1$	$26 \pm 6$
$Zn^{2+}$	$59 \pm 16$	$214 \pm 66$
$Mn^{2+}$	$56 \pm 12$	$579 \pm 77$

Afin de minimiser la quantité d'ion métallique utilisée, nous avons choisi de privilégier l'utilisation du  $Zn^{2+}$  au lieu du  $Mn^{2+}$ , car une concentration optimale moindre est requise pour observer une variation de signal. Nous avons ainsi effectué une courbe dose-réponse en présence de  $40 \mu M$  d'ion  $Zn^{2+}$ , dont les résultats sont présentés dans la Figure 42. Une valeur de  $K_d$  apparent a été estimée à  $8,6 \pm 2,7 \mu M$ , qui se rapproche de celle obtenue lors de la sélection initiale de l'aptamère, indiquant que son affinité pour la cible reste globalement inchangée. L'aptitude de l'aptamère intégralement substitué par des liaisons PS à reconnaître sa cible avec une affinité comparable est une caractéristique des plus intéressantes, qui nécessite toutefois d'être confirmée par des expérimentations complémentaires utilisant d'autres techniques orthogonales. Par ailleurs, des expériences menées en format direct ou avec la D-tyrosinamide et une autre séquence d'aptamère (3'F-PS-apt-A, aptamère anti-adénosine) ont démontré une réponse significative et spécifique pour la détection de L-tyrosinamide.



**Figure 42.** Changement d’anisotropie de fluorescence de sondes aptamériques en fonction de la concentration en tyrosinamide, en présence ou non de 40 μM d’ion Zn<sup>2+</sup>. Conditions : 10 mM de tampon MES, 0 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 6.3, température ambiante.

Compte tenu de la promesse de ces résultats préliminaires, montrant que notre stratégie de détection fonctionne en utilisant les ions Zn<sup>2+</sup> comme éléments de commutation structurale, plusieurs perspectives émergent de cette étude. Tout d’abord, il serait opportun de travailler sur une éventuelle optimisation des conditions expérimentales par exemple la force ionique ou la concentration en MgCl<sub>2</sub> dans le tampon de liaison. Ensuite, une investigation plus approfondie de la cinétique de réponse et de l’applicabilité de cette méthode dans un milieu complexe serait envisageable. De plus, au vu des données encourageantes obtenues avec les ions Mn<sup>2+</sup> présentées dans la Figure 41, il pourrait être pertinent de réaliser des expérimentations supplémentaires en présence de ces ions, incluant par exemple de nouvelles courbes de titrage, ainsi que des courbes dose-réponse en fonction de la concentration en cible. Enfin, l’exploration d’autres systèmes aptamère-cible permettrait d’évaluer l’impact de la modification de chaque liaison phosphodiester en liaison PS sur la signalisation, en fonction de la structure secondaire de l’aptamère. Ces démarches complémentaires renforceraient ainsi la pertinence de notre approche pour des applications futures.





# Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse a abouti au développement d'une stratégie novatrice consistant à exploiter les propriétés des ions métalliques de transition et post-transition en les transformant en outils de commutation pour la conception de divers aptacapteurs. Cette approche a été déclinée en plusieurs versions, chacune apportant les avantages d'une facilité de mise en œuvre, d'un coût abordable, ainsi qu'une détection moléculaire intrinsèquement rapide, également facilitée par l'usage d'un lecteur de microplaques.

Le premier aptacapteur s'est distingué par sa capacité à fonctionner avec des aptamères présentant des structures secondaires diversifiées, sans nécessiter de modifications chimiques. Cette caractéristique représente un atout important dans la mesure où elle offre une grande flexibilité d'application de notre méthode, permettant de ne pas se restreindre à un seul type d'aptamère. De plus, cela dispense de la nécessité de connaître précisément la structure secondaire de l'aptamère, ce qui simplifie considérablement le processus.

Le deuxième aptacapteur a permis d'explorer le potentiel de quenching que comportent certains ions métalliques de transition. Ce mécanisme a été exploité à notre avantage et a révélé la capacité de ces ions à stabiliser certains complexes aptamère-cible, pouvant ainsi constituer une alternative intéressante à l'utilisation d'espèces alcalino-terreuses couramment employées dans cet objectif, telles que  $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$ . Jusqu'à présent, cette observation n'a été démontrée que dans le cas du complexe aptamère-L-tyrosinamide, et des investigations futures pourraient être entreprises pour déterminer si ce phénomène est également présent dans d'autres systèmes.

Enfin, la dernière approche, préliminaire, a tenu compte des exigences liées au développement de dispositifs point-of-care en visant à rendre notre méthode moins risquée pour la santé et plus éco-responsable grâce à l'utilisation d'ions métalliques de toxicité réduite comparativement aux deux aptacapteurs précédents. Bien que cette approche ait nécessité une modification chimique de l'aptamère, à savoir la substitution de toutes les liaisons phosphodiester par des liaisons phosphorothioate, il a été montré que les propriétés de reconnaissance de la cible étaient globalement conservées. De plus, ces ajustements restent réalisables sur le plan commercial

sans engendrer une augmentation significative des coûts de production (166 € HT pour l'aptamère avec liaisons PS *versus* 107 € HT pour l'aptamère non modifié pour une échelle de synthèse de 40 nmol, représentant environ une centaine de courbes dose-réponse, chez notre fournisseur Eurogentec). Toutefois, des investigations et optimisations ultérieures seront nécessaires pour assurer la viabilité de cette approche.

Dans l'ensemble, cette thèse a mis en lumière l'intérêt et le potentiel des ions métalliques de transition et post-transition pour enrichir l'arsenal des méthodes de détection des petites molécules, répondant aux critères essentiels pour un biocapteur en termes de simplicité de mise en œuvre et de rapport coût-efficacité.

Les différents travaux présentés dans ce manuscrit permettent d'envisager plusieurs perspectives à explorer. La première serait d'étudier d'autres fluorophores anioniques, telles que la pyranine (HPTS) ou certaines hydroxycoumarines, ou zwitterioniques, par exemple le TMR, afin d'élargir la gamme de marqueurs fluorescents utilisables. Par ailleurs, un aspect intéressant consisterait à analyser l'impact de leur emplacement au sein de la séquence aptamérique sur le changement de signal observé. En effet, nous avons principalement testé les positions situées aux extrémités des aptamères, bien que des travaux antérieurs aient mis en évidence l'influence des bases avoisinantes sur l'intensité ou l'anisotropie de fluorescence obtenue.<sup>183,289</sup>

Une autre perspective pourrait consister à transposer notre méthode à d'autres modes de transduction. Comme évoqué précédemment, la nature électrostatique du premier aptacapteur offre la possibilité de concevoir des dispositifs électrochimiques tels que des transistors à effet de champ (FET), qui reposent sur des variations du potentiel de surface causées par un transfert de charge au niveau d'un matériau semi-conducteur. Ce type de plateforme présente les avantages d'être « label-free » et facilement miniaturisable, des caractéristiques attrayantes pour le développement de biocapteurs destinés à une utilisation sur le terrain.

En cas de nouvelles preuves de concept basées sur les idées décrites ci-dessus, il est important de considérer le choix de cibles pertinentes d'un point de vue biologique, en supplément d'une évaluation initiale sur un système modèle. Cette démarche a été entreprise dans le cadre de notre premier travail, avec l'application à la détection de mycotoxines ou de cocaïne, mais cela n'a pas été réitéré dans nos travaux ultérieurs. Actuellement, un certain nombre d'aptamères sont sélectionnés contre une variété d'analytes d'intérêt, en partie grâce à l'évolution des technologies SELEX, avec de nouvelles méthodologies qui sont constamment

développées. Il serait intéressant d'exploiter cette avancée pour élaborer des preuves de concept en adéquation avec les besoins actuels sur le terrain.

Les aptamères émergent comme une alternative prometteuse aux anticorps, non seulement pour favoriser une approche scientifique plus éthique, mais également pour étendre la détection à un vaste panel de cibles. Ils ouvrent la voie à une diversité impressionnante de schémas, contribuant ainsi à la variété des biocapteurs proposés. Comme évoqué précédemment, quelques sociétés biotechnologiques ont récemment entrepris de commercialiser des dispositifs de détection biomoléculaire utilisant les aptamères. Ainsi, le développement de notre méthode en dispositif point-of-care représenterait une opportunité intéressante, bien que cela implique la nécessité de surmonter certains défis. Afin de pouvoir envisager la translation industrielle et/ou hospitalière d'aptacapteurs développés en recherche académique, il est important d'accentuer nos efforts dans l'élaboration de protocoles standardisés pour la sélection et la caractérisation des aptamères. De plus, il est crucial de documenter de manière précise les propriétés de chaque aptamère sélectionné ainsi que les technologies employées pour leur évaluation, ce afin de faciliter le choix de systèmes biologiquement pertinents pour le développement d'aptacapteurs, comme évoqué dans le paragraphe précédent. En outre, il serait judicieux de mener des expériences rigoureuses de validation de méthode analytique, incluant des mesures de linéarité, spécificité, justesse, fidélité, et de les comparer à d'autres méthodes. Enfin, l'application de ces dispositifs en matrice complexe devient de plus en plus essentielle pour renforcer leur utilité. Pour cela, il serait souhaitable de privilégier l'utilisation de milieux pertinents directement issus du terrain, tels que des échantillons biologiques, alimentaires ou environnementaux. Cette démarche contribue à accroître la fiabilité et la validité des résultats obtenus par ces capteurs, en simulant au mieux les conditions réelles dans lesquelles ils seront utilisés, et de s'assurer qu'ils répondent aux besoins pratiques des usagers dans les domaines d'application escomptés.



## Références bibliographiques

- (1) Peltomaa, R.; Glahn-Martínez, B.; Benito-Peña, E.; Moreno-Bondi, M. C. Optical Biosensors for Label-Free Detection of Small Molecules. *Sensors* **2018**, *18* (12), 4126.
- (2) Hayat, A.; Marty, J. L. Aptamer Based Electrochemical Sensors for Emerging Environmental Pollutants. *Front. Chem.* **2014**, *2*.
- (3) Yu, H.; Alkhamis, O.; Canoura, J.; Liu, Y.; Xiao, Y. Advances and Challenges in Small-Molecule DNA Aptamer Isolation, Characterization, and Sensor Development. *Angew Chem Int Ed Engl* **2021**, *60* (31), 16800–16823.
- (4) Jayasena, S. D. Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clin. Chem.* **1999**, *45* (9), 1628–1650.
- (5) Liu, S.; Xu, Y.; Jiang, X.; Tan, H.; Ying, B. Translation of Aptamers toward Clinical Diagnosis and Commercialization. *Biosens. Bioelectron.* **2022**, *208*, 114168.
- (6) Kazakov, S. A. Nucleic Acid Binding and Catalysis by Metal Ions. In *Bioorganic Chemistry. Part I: Nucleic Acids.*; Hecht, S.M.: Oxford University Press, New York-Oxford, 1996; pp 244-287 ; 467–476.
- (7) Defranceschi, M. Classification périodique des éléments. *Techniques de l'ingénieur*. 2013.
- (8) Ball, D. W.; Key, J. A. Electronic Structure and the Periodic Table. In *Introductory Chemistry*; BCcampus, 2014.
- (9) RSC *Visual Elements Periodic Table*. <https://web.archive.org/web/20120730172905/http://www.rsc.org/periodic-table> (accessed 2023-05-10).
- (10) IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology, 2nd Ed. (the "Gold Book")*. Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online Version (2019-) Created by S. J. Chalk.
- (11) Prashanth, L.; Kattapagari, K. K.; Chitturi, R. T.; Baddam, V. R. R.; Prasad, L. K. A Review on Role of Essential Trace Elements in Health and Disease. *J. Dr. NTR Univ. Health Sci.* **2015**, *4* (2), 75.
- (12) Zoroddu, M. A.; Aaseth, J.; Crisponi, G.; Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M. The Essential Metals for Humans: A Brief Overview. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *195*, 120–129.
- (13) Zhou, W.; Saran, R.; Liu, J. Metal Sensing by DNA. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (12), 8272–8325.
- (14) Anastassopoulou, J. Metal–DNA Interactions. *J. Mol. Struct.* **2003**, *651–653*, 19–26.
- (15) Jaishankar, M.; Tseten, T.; Anbalagan, N.; Mathew, B. B.; Beeregowda, K. N. Toxicity, Mechanism and Health Effects of Some Heavy Metals. *Interdiscip Toxicol* **2014**, *7* (2), 60–72.
- (16) World Health Organization. *Arsenic*. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/arsenic> (accessed 2023-03-23).

- (17) World Health Organization. *Intoxication au plomb et santé*. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health> (accessed 2023-03-23).
- (18) World Health Organization. *Mercurie et santé*. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health> (accessed 2023-03-23).
- (19) Grzych, G. *Génétique*, 1ere ed.; De Boeck Supérieur, 2017.
- (20) Neidle, S.; Sanderson, M. *Principles of Nucleic Acid Structure*, 2nd ed.; Academic Press, 2021.
- (21) Hackl, E. V.; Kornilova, S. V.; Blagoi, Y. P. DNA Structural Transitions Induced by Divalent Metal Ions in Aqueous Solutions. *Int. J. Biol. Macromol.* **2005**, *35* (3–4), 175–191.
- (22) Sigel, H. Interactions of Metal Ions with Nucleotides and Nucleic Acids and Their Constituents. *Chem Soc Rev* **1993**, *22* (4), 255–267.
- (23) Dallas, A.; Vlassov, A. V.; Kazakov, S. A. Principles of Nucleic Acid Cleavage by Metal Ions. In *Artificial Nucleases*; Zenkova, M. A., Ed.; Gross, H. J., Series Ed.; Nucleic Acids and Molecular Biology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2004; Vol. 13, pp 61–88.
- (24) Shamsi, M. H.; Kraatz, H.-B. Interactions of Metal Ions with DNA and Some Applications. *J Inorg Organomet Polym* **2013**, *23* (1), 4–23.
- (25) Misra, V. K.; Draper, D. E. On the Role of Magnesium Ions in RNA Stability. *Biopolymers* **1998**, *48* (2–3), 113–135.
- (26) Kazakov, S.; Hecht, S. Nucleic Acid–Metal Ion Interactions. In *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*; 2006.
- (27) Granot, J.; Feigon, J.; Kearns, D. R. Interactions of DNA with Divalent Metal Ions. I. <sup>31</sup>P-Nmr Studies. *Biopolymers* **1982**, *21* (1), 181–201.
- (28) Sigel, R. K. O.; Sigel, H. A Stability Concept for Metal Ion Coordination to Single-Stranded Nucleic Acids and Affinities of Individual Sites. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43* (7), 974–984.
- (29) Bartova, S.; Alberti, E.; Sigel, R. K. O.; Donghi, D. Metal Ion Binding to an RNA Internal Loop. *Inorg. Chim. Acta* **2016**, *452*, 104–110.
- (30) Zheng, H.; Shabalin, I. G.; Handing, K. B.; Bujnicki, J. M.; Minor, W. Magnesium-Binding Architectures in RNA Crystal Structures: Validation, Binding Preferences, Classification and Motif Detection. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (7), 3789–3801.
- (31) Duguid, J.; Bloomfield, V. A.; Benevides, J.; Thomas, G. J. Raman Spectroscopy of DNA-Metal Complexes. I. Interactions and Conformational Effects of the Divalent Cations: Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, and Cd. *Biophys. J.* **1993**, *65* (5), 1916–1928.
- (32) Guo, W.; Zhang, C.; Ma, T.; Liu, X.; Chen, Z.; Li, S.; Deng, Y. Advances in Aptamer Screening and Aptasensors' Detection of Heavy Metal Ions. *J Nanobiotechnology* **2021**, *19* (1), 166.
- (33) Sissoëff, I.; Grisvard, J.; Guillé, E. Studies on Metal Ions-DNA Interactions: Specific Behaviour of Reiterative DNA Sequences. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1978**, *31*, 165–199.

- (34)Shin, Y. A.; Heim, J. M.; Eichhorn, G. L. Interaction of Metal Ions with Polynucleotides and Related Compounds. XX. Control of the Conformation of Polyriboadenylic Acid by Divalent Metal Ions. *Bioorg. Chem.* **1972**, *1* (2), 149–163.
- (35)Li, W.; Zhang, Z.; Zhou, W.; Liu, J. Kinetic Discrimination of Metal Ions Using DNA for Highly Sensitive and Selective Cr<sup>3+</sup> Detection. *ACS Sens.* **2017**, *2* (5), 663–669.
- (36)Ma, H.; Li, W.; Zhou, W.; Liu, J. Site-Selective Labeling of Chromium(III) as a Quencher on DNA for Molecular Beacons. *ChemPlusChem* **2017**, *82* (9), 1224–1230.
- (37)Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (22), 3533–3539.
- (38)Pearson, R. G. Hard and Soft Acids and Bases, HSAB, Part 1: Fundamental Principles. *J. Chem. Educ.* **1968**, *45* (9), 581.
- (39)Eichhorn, G. L.; Shin, Y. A. Interaction of Metal Ions with Polynucleotides and Related Compounds. XII. The Relative Effect of Various Metal Ions on DNA Helicity. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90* (26), 7323–7328.
- (40)Venancio-Marques, A.; Rudiuk, S.; Baigl, D. Structures hybrides ADN-protéines : synthèse et applications, *Techniques de l'ingénieur*, 2014.
- (41)Ellington, A. D.; Szostak, J. W. In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature* **1990**, *346* (6287), 818–822.
- (42)Tuerk, C.; Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science* **1990**, *249* (4968), 505–510.
- (43)Song, S.; Wang, L.; Li, J.; Fan, C.; Zhao, J. Aptamer-Based Biosensors. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2008**, *27* (2), 108–117.
- (44)McKeague, M.; McConnell, E. M.; Cruz-Toledo, J.; Bernard, E. D.; Pach, A.; Mastronardi, E.; Zhang, X.; Beking, M.; Francis, T.; Giamberardino, A.; Cabecinha, A.; Ruscito, A.; Aranda-Rodriguez, R.; Dumontier, M.; DeRosa, M. C. Analysis of In Vitro Aptamer Selection Parameters. *J Mol Evol* **2015**, *81* (5), 150–161.
- (45)Bridonneau, P.; Chang, Y.-F.; O'Connell, D.; Gill, S. C.; Snyder, D. W.; Johnson, L.; Goodson, Theodore; Herron, D. K.; Parma, D. H. High-Affinity Aptamers Selectively Inhibit Human Nonpancreatic Secretory Phospholipase A2 (Hnps-PLA2). *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (6), 778–786.
- (46)Bock, L. C.; Griffin, L. C.; Latham, J. A.; Vermaas, E. H.; Toole, J. J. Selection of Single-Stranded DNA Molecules That Bind and Inhibit Human Thrombin. *Nature* **1992**, *355* (6360), 564–566.
- (47)Wang, L.; Liu, B.; Yin, H.; Wei, J.; Qian, X.; Yu, L. Selection of DNA Aptamer That Specific Binding Human Carcinoembryonic Antigen in Vitro. *J. Nanjing Med. Univ* **2007**, *21* (5), 277–281.
- (48)Lee, Y. J.; Lee, S.-W. Regression of Hepatocarcinoma Cells Using RNA Aptamer Specific to Alpha-Fetoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **2012**, *417* (1), 521–527.
- (49)Green, L. S.; Jellinek, D.; Jenison, R.; Östman, A.; Heldin, C.-H.; Janjic, N. Inhibitory DNA Ligands to Platelet-Derived Growth Factor B-Chain. *Biochemistry* **1996**, *35* (45), 14413–14424.



- (50)Jellinek, D.; Lynott, C. K.; Rifkin, D. B.; Janjić, N. High-Affinity RNA Ligands to Basic Fibroblast Growth Factor Inhibit Receptor Binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90* (23), 11227–11231.
- (51)Ruscito, A.; DeRosa, M. C. Small-Molecule Binding Aptamers: Selection Strategies, Characterization, and Applications. *Front Chem* **2016**, *4*, 14.
- (52)Huizenga, D. E.; Szostak, J. W. A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP. *Biochemistry* **1995**, *34* (2), 656–665.
- (53)Ma, X.; Wang, W.; Chen, X.; Xia, Y.; Wu, S.; Duan, N.; Wang, Z. Selection, Identification, and Application of Aflatoxin B1 Aptamer. *Eur Food Res Technol* **2014**, *238* (6), 919–925.
- (54)Cruz-Aguado, J. A.; Penner, G. Determination of Ochratoxin A with a DNA Aptamer. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (22), 10456–10461.
- (55)Handy, S. M.; Yakes, B. J.; DeGrasse, J. A.; Campbell, K.; Elliott, C. T.; Kanyuck, K. M.; DeGrasse, S. L. First Report of the Use of a Saxitoxin–Protein Conjugate to Develop a DNA Aptamer to a Small Molecule Toxin. *Toxicon* **2013**, *61*, 30–37.
- (56)Vianini, E.; Palumbo, M.; Gatto, B. In Vitro Selection of DNA Aptamers That Bind L-Tyrosinamide. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9* (10), 2543–2548.
- (57)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.
- (58)Nakatsuka, N.; Yang, K.-A.; Abendroth, J. M.; Cheung, K.; Xu, X.; Yang, H.; Zhao, C.; Zhu, B.; Rim, Y. S.; Yang, Y.; Weiss, P. S.; Stojanović, M. N.; Andrews, A. M. Aptamer-Field-Effect Transistors Overcome Debye Length Limitations for Small-Molecule Sensing. *Science (New York, N.Y.)* **2018**, *362* (6412), 319.
- (59)Mannironi, C.; Di Nardo, A.; Fruscoloni, P.; Tocchini-Valentini, G. P. In Vitro Selection of Dopamine RNA Ligands. *Biochemistry* **1997**, *36* (32), 9726–9734.
- (60)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.
- (61)Ebrahimi, M.; Hamzeiy, H.; Barar, J.; Barzegari, A.; Omid, Y. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment Selection of Specific Aptamer for Sensing of Methamphetamine. *Sens. Lett.* **2013**, *11* (3), 566–570.
- (62)Niazi, J. H.; Lee, S. J.; Gu, M. B. Single-Stranded DNA Aptamers Specific for Antibiotics Tetracyclines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16* (15), 7245–7253.
- (63)Wang, Y.; Rando, R. R. Specific Binding of Aminoglycoside Antibiotics to RNA. *Chem. Biol* **1995**, *2* (5), 281–290.
- (64)Jenison, R.; Gill, S.; Pardi, A.; Polisky, B. High-Resolution Molecular Discrimination by RNA. *Science* **1994**, *263* (5152), 1425–1429.

- (65) Kiani, Z.; Shafiei, M.; Rahimi-Moghaddam, P.; Karkhane, A. A.; Ebrahimi, S. A. In Vitro Selection and Characterization of Deoxyribonucleic Acid Aptamers for Digoxin. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *748*, 67–72.
- (66) Nguyen, V.-T.; Seop Kwon, Y.; Hoon Kim, J.; Bock Gu, M. Multiple GO-SELEX for Efficient Screening of Flexible Aptamers. *Chemical Communications* **2014**, *50* (72), 10513–10516.
- (67) Williams, R. M.; Kulick, A. R.; Yedlapalli, S.; Battistella, L.; Hajiran, C. J.; Sooter, L. J. In Vitro Selection of a Single-Stranded DNA Molecular Recognition Element Specific for Bromacil. *J Nucleic Acids* **2014**, *2014*, 102968.
- (68) Skouridou, V.; Jauset-Rubio, M.; Ballester, P.; Bashammakh, A. S.; El-Shahawi, M. S.; Alyoubi, A. O.; O'Sullivan, C. K. Selection and Characterization of DNA Aptamers against the Steroid Testosterone. *Microchim Acta* **2017**, *184* (6), 1631–1639.
- (69) Kim, Y. S.; Jung, H. S.; Matsuura, T.; Lee, H. Y.; Kawai, T.; Gu, M. B. Electrochemical Detection of 17 $\beta$ -Estradiol Using DNA Aptamer Immobilized Gold Electrode Chip. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22* (11), 2525–2531.
- (70) Contreras Jiménez, G.; Eissa, S.; Ng, A.; Alhadrami, H.; Zourob, M.; Siaj, M. Aptamer-Based Label-Free Impedimetric Biosensor for Detection of Progesterone. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (2), 1075–1082.
- (71) Williams, K. P.; Liu, X. H.; Schumacher, T. N.; Lin, H. Y.; Ausiello, D. A.; Kim, P. S.; Bartel, D. P. Bioactive and Nuclease-Resistant L-DNA Ligand of Vasopressin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94* (21), 11285–11290.
- (72) Ylera, F.; Lurz, R.; Erdmann, V. A.; Fürste, J. P. Selection of RNA Aptamers to the Alzheimer's Disease Amyloid Peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **2002**, *290* (5), 1583–1588.
- (73) Nieuwlandt, D.; Wecker, M.; Gold, L. In Vitro Selection of RNA Ligands to Substance P. *Biochemistry* **1995**, *34* (16), 5651–5659.
- (74) Kim, M.; Um, H.-J.; Bang, S.; Lee, S.-H.; Oh, S.-J.; Han, J.-H.; Kim, K.-W.; Min, J.; Kim, Y.-H. Arsenic Removal from Vietnamese Groundwater Using the Arsenic-Binding DNA Aptamer. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43* (24), 9335–9340.
- (75) Wu, Y.; Zhan, S.; Wang, L.; Zhou, P. Selection of a DNA Aptamer for Cadmium Detection Based on Cationic Polymer Mediated Aggregation of Gold Nanoparticles. *Analyst* **2014**, *139* (6), 1550–1561.
- (76) Chen, Y.; Li, H.; Gao, T.; Zhang, T.; Xu, L.; Wang, B.; Wang, J.; Pei, R. Selection of DNA Aptamers for the Development of Light-up Biosensor to Detect Pb(II). *Sens. Actuators B: Chem.* **2018**, *254*, 214–221.
- (77) Cho, Y. S.; Lee, E. J.; Lee, G.-H.; Hah, S. S. Aptamer Selection for Fishing of Palladium Ion Using Graphene Oxide-Adsorbed Nanoparticles. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (23), 5536–5539.

- (78) Song, Y.; Song, J.; Wei, X.; Huang, M.; Sun, M.; Zhu, L.; Lin, B.; Shen, H.; Zhu, Z.; Yang, C. Discovery of Aptamers Targeting the Receptor-Binding Domain of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (14), 9895–9900.
- (79) Feng, H.; Beck, J.; Nassal, M.; Hu, K. A SELEX-Screened Aptamer of Human Hepatitis B Virus RNA Encapsidation Signal Suppresses Viral Replication. *PLOS ONE* **2011**, *6* (11), e27862.
- (80) 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.
- (81) Chen, H.-L.; Hsiao, W.-H.; Lee, H.-C.; Wu, S.-C.; Cheng, J.-W. Selection and Characterization of DNA Aptamers Targeting All Four Serotypes of Dengue Viruses. *PLoS ONE* **2015**, *10* (6), e0131240.
- (82) Lee, Y. J.; Han, S. R.; Maeng, J.-S.; Cho, Y.-J.; Lee, S.-W. In Vitro Selection of Escherichia Coli O157:H7-Specific RNA Aptamer. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **2012**, *417* (1), 414–420.
- (83) Duan, N.; Ding, X.; He, L.; Wu, S.; Wei, Y.; Wang, Z. Selection, Identification and Application of a DNA Aptamer against *Listeria Monocytogenes*. *Food Control* **2013**, *33* (1), 239–243.
- (84) Cao, X.; Li, S.; Chen, L.; Ding, H.; Xu, H.; Huang, Y.; Li, J.; Liu, N.; Cao, W.; Zhu, Y.; Shen, B.; Shao, N. Combining Use of a Panel of ssDNA Aptamers in the Detection of *Staphylococcus Aureus*. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37* (14), 4621–4628.
- (85) Chen, F.; Zhou, J.; Luo, F.; Mohammed, A.-B.; Zhang, X.-L. Aptamer from Whole-Bacterium SELEX as New Therapeutic Reagent against Virulent *Mycobacterium Tuberculosis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **2007**, *357* (3), 743–748.
- (86) Jain, P.; Chakma, B.; Singh, N. K.; Patra, S.; Goswami, P. Aromatic Surfactant as Aggregating Agent for Aptamer-Gold Nanoparticle-Based Detection of *Plasmodium Lactate Dehydrogenase*. *Mol Biotechnol* **2016**, *58* (7), 497–508.
- (87) Ramos, E.; Piñeiro, D.; Soto, M.; Abanades, D. R.; Martín, M. E.; Salinas, M.; González, V. M. A DNA Aptamer Population Specifically Detects *Leishmania Infantum* H2A Antigen. *Lab Invest* **2007**, *87* (5), 409–416.
- (88) Ulrich, H.; Magdesian, M. H.; Alves, M. J. M.; Colli, W. In Vitro Selection of RNA Aptamers That Bind to Cell Adhesion Receptors of *Trypanosoma Cruzi* and Inhibit Cell Invasion \*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (23), 20756–20762.
- (89) Seo, J.-W.; Young Kim, J.; Hee Kim, D.; Oh, J.-J.; Jun Kim, Y.; Kim, G.-H. Selection and Characterization of Toxic *Aspergillus Spore*-Specific DNA Aptamer Using Spore-SELEX. *RSC Adv.* **2021**, *11* (5), 2608–2615.
- (90) Shi, H.; Cui, W.; He, X.; Guo, Q.; Wang, K.; Ye, X.; Tang, J. Whole Cell-SELEX Aptamers for Highly Specific Fluorescence Molecular Imaging of Carcinomas In Vivo. *PLOS ONE* **2013**, *8* (8), e70476.

- (91)Shangguan, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (32), 11838–11843.
- (92)Tang, Z.; Shangguan, D.; Wang, K.; Shi, H.; Sefah, K.; Mallikaratchy, P.; Chen, H. W.; Li, Y.; Tan, W. Selection of Aptamers for Molecular Recognition and Characterization of Cancer Cells. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (13), 4900–4907.
- (93)Hicke, B. J.; Marion, C.; Chang, Y.-F.; Gould, T.; Lynott, C. K.; Parma, D.; Schmidt, P. G.; Warren, S. Tenascin-C Aptamers Are Generated Using Tumor Cells and Purified Protein \*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (52), 48644–48654.
- (94)Li, L.; Wan, J.; Wen, X.; Guo, Q.; Jiang, H.; Wang, J.; Ren, Y.; Wang, K. Identification of a New DNA Aptamer by Tissue-SELEX for Cancer Recognition and Imaging. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (19), 7369–7377.
- (95)Li, S.; Xu, H.; Ding, H.; Huang, Y.; Cao, X.; Yang, G.; Li, J.; Xie, Z.; Meng, Y.; Li, X.; Zhao, Q.; Shen, B.; Shao, N. Identification of an Aptamer Targeting hnRNP A1 by Tissue Slide-Based SELEX. *J. Pathol.* **2009**, *218* (3), 327–336.
- (96)Zhong, W.; Pu, Y.; Tan, W.; Liu, J.; Liao, J.; Liu, B.; Chen, K.; Yu, B.; Hu, Y.; Deng, Y.; Zhang, J.; Liu, H. Identification and Application of an Aptamer Targeting Papillary Thyroid Carcinoma Using Tissue-SELEX. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (13), 8289–8297.
- (97)Walter, J.-G.; Heilkenbrinker, A.; Austerjost, J.; Timur, S.; Stahl, F.; Schepe, T. Aptasensors for Small Molecule Detection. *Z. Naturforsch. B* **2012**, *67* (10), 976–986.
- (98)Zhou, J.; Battig, M. R.; Wang, Y. Aptamer-Based Molecular Recognition for Biosensor Development. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *398* (6), 2471–2480.
- (99)Gooch, J.; Daniel, B.; Parkin, M.; Frascione, N. Developing Aptasensors for Forensic Analysis. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2017**, *94*, 150–160.
- (100) Lyu, C.; Khan, I. M.; Wang, Z. Capture-SELEX for Aptamer Selection: A Short Review. *Talanta* **2021**, *229*, 122274.
- (101) Gu, H.; Duan, N.; Wu, S.; Hao, L.; Xia, Y.; Ma, X.; Wang, Z. Graphene Oxide-Assisted Non-Immobilized SELEX of Okadaic Acid Aptamer and the Analytical Application of Aptasensor. *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 21665.
- (102) Mosing, R. K.; Bowser, M. T. Isolating Aptamers Using Capillary Electrophoresis-SELEX (CE-SELEX). *Methods Mol Biol* **2009**, *535*, 33–43.
- (103) El-Aziz, T. M. A.; Ravelet, C.; Molgo, J.; Fiore, E.; Pale, S.; Amar, M.; Al-Khoury, S.; Dejeu, J.; Fadl, M.; Ronjat, M.; Taiwe, G. S.; Servent, D.; Peyrin, E.; De Waard, M. Efficient Functional Neutralization of Lethal Peptide Toxins in Vivo by Oligonucleotides. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 7202.
- (104) Lisi, S.; Fiore, E.; Scarano, S.; Pascale, E.; Boehman, Y.; Ducongé, F.; Chierici, S.; Minunni, M.; Peyrin, E.; Ravelet, C. Non-SELEX Isolation of DNA Aptamers for the Homogeneous-Phase Fluorescence Anisotropy Sensing of Tau Proteins. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1038*, 173–181.

- (105) McKeague, M.; Derosa, M. C. Challenges and Opportunities for Small Molecule Aptamer Development. *J Nucleic Acids* **2012**, *2012*, 748913.
- (106) Liu, R.; Zhang, F.; Sang, Y.; Katouzian, I.; Jafari, S. M.; Wang, X.; Li, W.; Wang, J.; Mohammadi, Z. Screening, Identification, and Application of Nucleic Acid Aptamers Applied in Food Safety Biosensing. *Trends Food Sci Technol* **2022**, *123*, 355–375.
- (107) Thevendran, R.; Citartan, M. Assays to Estimate the Binding Affinity of Aptamers. *Talanta* **2022**, *238*, 122971.
- (108) Bao, J.; Krylova, S. M.; Reinstein, O.; Johnson, P. E.; Krylov, S. N. Label-Free Solution-Based Kinetic Study of Aptamer–Small Molecule Interactions by Kinetic Capillary Electrophoresis with UV Detection Revealing How Kinetics Control Equilibrium. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (22), 8387–8390.
- (109) N. Kammer, M.; R. Olmsted, I.; K. Kussrow, A.; J. Morris, M.; W. Jackson, G.; J. Bornhop, D. Characterizing Aptamer Small Molecule Interactions with Backscattering Interferometry. *Analyst* **2014**, *139* (22), 5879–5884.
- (110) McKeague, M.; De Girolamo, A.; Valenzano, S.; Pascale, M.; Ruscito, A.; Velu, R.; Frost, N. R.; Hill, K.; Smith, M.; McConnell, E. M.; DeRosa, M. C. Comprehensive Analytical Comparison of Strategies Used for Small Molecule Aptamer Evaluation. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (17), 8608–8612.
- (111) Onaş, A. M.; Dascălu, C.; Raicopol, M. D.; Pilan, L. Critical Design Factors for Electrochemical Aptasensors Based on Target-Induced Conformational Changes: The Case of Small-Molecule Targets. *Biosensors* **2022**, *12* (10), 816.
- (112) Zara, L.; Achilli, S.; Chovelon, B.; Fiore, E.; Toulmé, J.-J.; Peyrin, E.; Ravelet, C. Anti-Pesticide DNA Aptamers Fail to Recognize Their Targets with Asserted Micromolar Dissociation Constants. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1159*, 338382.
- (113) Kedzierski, S.; Caltagirone, T.; Khoshnejad, M. Synthetic Antibodies: The Emerging Field of Aptamers. *BioProcess J* **2013**, *11* (4), 46–49.
- (114) Aydindogan, E.; Balaban, S.; Evran, S.; Coskunol, H.; Timur, S. A Bottom-Up Approach for Developing Aptasensors for Abused Drugs: Biosensors in Forensics. *Biosensors* **2019**, *9* (4), 118.
- (115) Keefe, A. D.; Pai, S.; Ellington, A. Aptamers as Therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9* (7), 537–550.
- (116) Sullenger, B. A.; Gallardo, H. F.; Ungers, G. E.; Gilboa, E. Overexpression of TAR Sequences Renders Cells Resistant to Human Immunodeficiency Virus Replication. *Cell* **1990**, *63* (3), 601–608.
- (117) 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. *J Control Release.* **2022**, *346*, 405–420.
- (118) Zhou, J.; Rossi, J. Aptamers as Targeted Therapeutics: Current Potential and Challenges. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16* (3), 181–202.

- (119) Li, L.; Xu, S.; Yan, H.; Li, X.; Yazd, H. S.; Li, X.; Huang, T.; Cui, C.; Jiang, J.; Tan, W. Nucleic Acid Aptamers for Molecular Diagnostics and Therapeutics: Advances and Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (5), 2221–2231.
- (120) Thevendran, R.; Navien, T. N.; Meng, X.; Wen, K.; Lin, Q.; Sarah, S.; Tang, T.-H.; Citartan, M. Mathematical Approaches in Estimating Aptamer-Target Binding Affinity. *Anal. Biochem.* **2020**, *600*, 113742.
- (121) Lin, P.-H.; Yen, S.-L.; Lin, M.-S.; Chang, Y.; Louis, S. R.; Higuchi, A.; Chen, W.-Y. Microcalorimetrics Studies of the Thermodynamics and Binding Mechanism between L - Tyrosinamide and Aptamer. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (21), 6665–6673.
- (122) 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.
- (123) Ng, E. W. M.; Shima, D. T.; Calias, P.; Cunningham, E. T.; Guyer, D. R.; Adamis, A. P. Pegaptanib, a Targeted Anti-VEGF Aptamer for Ocular Vascular Disease. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5* (2), 123–132.
- (124) *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](https://www.has-sante.fr/jcms/c_1714255/en/macugen-pegaptanib-anticorps-monoclonal-anti-vegf) (accessed 2023-05-24).
- (125) *Izervay: Uses, Dosage, Side Effects, Warnings*. Drugs.com. <https://www.drugs.com/izervay.html> (accessed 2023-09-15).
- (126) Inserm. *Les essais cliniques*. Inserm. <https://www.inserm.fr/nos-recherches/recherche-clinique/essais-cliniques-recherches-interventionnelles-portant-sur-produit-sante/> (accessed 2023-05-24).
- (127) Nimjee, S. M.; White, R. R.; Becker, R. C.; Sullenger, B. A. Aptamers as Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2017**, *57*, 61–79.
- (128) Hernández-Jiménez, M.; Abad-Santos, F.; Cotgreave, I.; Gallego, J.; Jilma, B.; Flores, A.; Jovin, T. G.; Vivancos, J.; Molina, C. A.; Montaner, J.; Casariego, J.; Dalsgaard, M.; Hernández-Pérez, M.; Liebeskind, D. S.; Cobo, E.; Ribo, M. APRIL: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized, Phase Ib/IIa Clinical Study of ApTOLL for the Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Front. Neurol.* **2023**, *14*.
- (129) Chandola, C.; Kalme, S.; Casteleijn, M. G.; Urtti, A.; Neerathilingam, M. Application of Aptamers in Diagnostics, Drug-Delivery and Imaging. *J Biosci* **2016**, *41* (3), 535–561.
- (130) Bagalkot, V.; Farokhzad, O. C.; Langer, R.; Jon, S. An Aptamer–Doxorubicin Physical Conjugate as a Novel Targeted Drug-Delivery Platform. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (48), 8149–8152.

- (131) Pichon, V.; Brothier, F.; Combès, A. Aptamer-Based-Sorbents for Sample Treatment—a Review. *Anal Bioanal Chem* **2015**, *407* (3), 681–698.
- (132) Vergara-Barberán, M.; Lerma-García, M. J.; Moga, A.; Carrasco-Correa, E. J.; Martínez-Pérez-Cejuela, H.; Beneito-Cambra, M.; Simó-Alfonso, E. F.; Herrero-Martínez, J. M. Recent Advances in Aptamer-Based Miniaturized Extraction Approaches in Food Analysis. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2021**, *138*, 116230.
- (133) Ravelet, C.; Grosset, C.; Peyrin, E. Liquid Chromatography, Electrochromatography and Capillary Electrophoresis Applications of DNA and RNA Aptamers. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1117* (1), 1–10.
- (134) Zhao, Q.; Wu, M.; Chris Le, X.; Li, X.-F. Applications of Aptamer Affinity Chromatography. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2012**, *41*, 46–57.
- (135) Penner, G. Commercialization of an Aptamer-Based Diagnostic Test. *IVD Technol* **2012**, *18*, 31–37.
- (136) De Girolamo, A.; Le, L.; Penner, G.; Schena, R.; Visconti, A. Analytical Performances of a DNA-Ligand System Using Time-Resolved Fluorescence for the Determination of Ochratoxin A in Wheat. *Anal Bioanal Chem* **2012**, *403* (9), 2627–2634.
- (137) Morin, P. Séparation de molécules pharmaceutiques chirales par les techniques chromatographiques et électrophorétiques. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **2009**, *67* (4), 241–250.
- (138) EMA. *Investigation of chiral active substances (human) - Scientific guideline*. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/investigation-chiral-active-substances\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/investigation-chiral-active-substances_en.pdf) (accessed 2023-07-18).
- (139) Michaud, M.; Jourdan, E.; Villet, A.; Ravel, A.; Grosset, C.; Peyrin, E. A DNA Aptamer as a New Target-Specific Chiral Selector for HPLC. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (28), 8672–8679.
- (140) Yang, X.; Bing, T.; Mei, H.; Fang, C.; Cao, Z.; Shangguan, D. Characterization and Application of a DNA Aptamer Binding to L-Tryptophan. *Analyst* **2011**, *136* (3), 577–585.
- (141) Brumbt, A.; Ravelet, C.; Grosset, C.; Ravel, A.; Villet, A.; Peyrin, E. Chiral Stationary Phase Based on a Biostable L-RNA Aptamer. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (7), 1993–1998.
- (142) Ravelet, C.; Boulkedid, R.; Ravel, A.; Grosset, C.; Villet, A.; Fize, J.; Peyrin, E. A L-RNA Aptamer Chiral Stationary Phase for the Resolution of Target and Related Compounds. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1076* (1), 62–70.
- (143) Ruta, J.; Grosset, C.; Ravelet, C.; Fize, J.; Villet, A.; Ravel, A.; Peyrin, E. Chiral Resolution of Histidine Using an Anti-d-Histidine l-RNA Aptamer Microbore Column. *J. Chromatogr. B* **2007**, *845* (2), 186–190.
- (144) André, C.; Berthelot, A.; Thomassin, M.; Guillaume, Y.-C. Enantioselective Aptameric Molecular Recognition Material: Design of a Novel Chiral Stationary Phase for Enantioseparation

- of a Series of Chiral Herbicides by Capillary Electrochromatography. *Electrophoresis* **2006**, *27* (16), 3254–3262.
- (145) Kim, Y. S.; Hyun, C. J.; Kim, I. A.; Gu, M. B. Isolation and Characterization of Enantioselective DNA Aptamers for Ibuprofen. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (10), 3467–3473.
- (146) Shoji, A.; Kuwahara, M.; Ozaki, H.; Sawai, H. Modified DNA Aptamer That Binds the (R)-Isomer of a Thalidomide Derivative with High Enantioselectivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (5), 1456–1464.
- (147) Tombelli, S.; Minunni, M.; Mascini, M. Aptamers-Based Assays for Diagnostics, Environmental and Food Analysis. *Biomol. Eng.* **2007**, *24* (2), 191–200.
- (148) Majdinasab, M.; Hayat, A.; Marty, J. L. Aptamer-Based Assays and Aptasensors for Detection of Pathogenic Bacteria in Food Samples. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2018**, *107*, 60–77.
- (149) Sarkar, N.; Sharma, R. S.; Kaushik, M. Exploring the Potential of DNA/RNA Aptamers in National Security. *Natl. Acad. Sci. Lett.* **2020**, *43* (2), 187–190.
- (150) Liu, L. S.; Wang, F.; Ge, Y.; Lo, P. K. Recent Developments in Aptasensors for Diagnostic Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (8), 9329–9358.
- (151) Li, H.-Y.; Jia, W.-N.; Li, X.-Y.; Zhang, L.; Liu, C.; Wu, J. Advances in Detection of Infectious Agents by Aptamer-Based Technologies. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9* (1), 1671–1681.
- (152) 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.
- (153) Webber, J.; Stone, T. C.; Katilius, E.; Smith, B. C.; Gordon, B.; Mason, M. D.; Tabi, Z.; Brewis, I. A.; Clayton, A. Proteomics Analysis of Cancer Exosomes Using a Novel Modified Aptamer-Based Array (SOMAscan™) Platform \*. *Mol. Cell Proteomics.* **2014**, *13* (4), 1050–1064.
- (154) Kraemer, S.; Vaught, J. D.; Bock, C.; Gold, L.; Katilius, E.; Keeney, T. R.; Kim, N.; Saccomano, N. A.; Wilcox, S. K.; Zichi, D.; Sanders, G. M. From SOMAmer-Based Biomarker Discovery to Diagnostic and Clinical Applications: A SOMAmer-Based, Streamlined Multiplex Proteomic Assay. *PLoS ONE* **2011**, *6* (10).
- (155) Gold, L.; Walker, J. J.; Wilcox, S. K.; Williams, S. Advances in Human Proteomics at High Scale with the SOMAscan Proteomics Platform. *New Biotechnology* **2012**, *29* (5), 543–549.



- (156) Kalra, P.; Dhiman, A.; Cho, W. C.; Bruno, J. G.; Sharma, T. K. Simple Methods and Rational Design for Enhancing Aptamer Sensitivity and Specificity. *Front. Mol. Biosci.* **2018**, *5*.
- (157) Kaur, H.; Bruno, J. G.; Kumar, A.; Sharma, T. K. Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines. *Theranostics* **2018**, *8* (15), 4016–4032.
- (158) Bhardwaj, T.; Kumar Sharma, T. Aptasensors for Full Body Health Checkup. *Biosens. Bioelectron.: X* **2022**, *11*, 100199.
- (159) Bouvier-Müller, A.; Ducongé, F. Application of Aptamers for in Vivo Molecular Imaging and Theranostics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2018**, *134*, 94–106.
- (160) Charlton, J.; Sennello, J.; Smith, D. In Vivo Imaging of Inflammation Using an Aptamer Inhibitor of Human Neutrophil Elastase. *Chem. Biol* **1997**, *4* (11), 809–816.
- (161) Hicke, B. J.; Stephens, A. W.; Gould, T.; Chang, Y.-F.; Lynott, C. K.; Heil, J.; Borkowski, S.; Hilger, C.-S.; Cook, G.; Warren, S.; Schmidt, P. G. Tumor Targeting by an Aptamer. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47* (4), 668–678.
- (162) Li, J.; Zheng, H.; Bates, P. J.; Malik, T.; Li, X.-F.; Trent, J. O.; Ng, C. K. Aptamer Imaging with Cu-64 Labeled AS1411: Preliminary Assessment in Lung Cancer. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, *41* (2), 179–185.
- (163) Wang, A. Z.; Bagalkot, V.; Vasilliou, C. C.; Gu, F.; Alexis, F.; Zhang, L.; Shaikh, M.; Yuet, K.; Cima, M. J.; Langer, R.; Kantoff, P. W.; Bander, N. H.; Jon, S.; Farokhzad, O. C. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle–Aptamer Bioconjugates for Combined Prostate Cancer Imaging and Therapy. *ChemMedChem* **2008**, *3* (9), 1311–1315.
- (164) Koudrina, A.; O'Brien, J.; Garcia, R.; Boisjoli, S.; Kan, P. T. M.; Tsai, E. C.; DeRosa, M. C. Assessment of Aptamer-Targeted Contrast Agents for Monitoring of Blood Clots in Computed Tomography and Fluoroscopy Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31* (12), 2737–2749.
- (165) Nakatsuka, M. A.; Barback, C. V.; Fitch, K. R.; Farwell, A. R.; Esener, S. C.; Mattrey, R. F.; Cha, J. N.; Goodwin, A. P. In Vivo Ultrasound Visualization of Non-Occlusive Blood Clots with Thrombin-Sensitive Contrast Agents. *Biomaterials* **2013**, *34* (37), 9559–9565.
- (166) Farrar, C. T.; William, C. M.; Hudry, E.; Hashimoto, T.; Hyman, B. T. RNA Aptamer Probes as Optical Imaging Agents for the Detection of Amyloid Plaques. *PLoS ONE* **2014**, *9* (2).
- (167) 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.
- (168) 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 <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy and Molecular Modeling. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (44), 15740–15748.

- (169) Lackey, H. H.; Peterson, E. M.; Harris, J. M.; Heemstra, J. M. Probing the Mechanism of Structure-Switching Aptamer Assembly by Super-Resolution Localization of Individual DNA Molecules. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (10), 6909–6917.
- (170) Zhu, Z.; Schmidt, T.; Mahrous, M.; Guieu, V.; Perrier, S.; Ravelet, C.; Peyrin, E. Optimization of the Structure-Switching Aptamer-Based Fluorescence Polarization Assay for the Sensitive Tyrosinamide Sensing. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *707* (1–2), 191–196.
- (171) 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.
- (172) Feagin, T. A.; Olsen, D. P. V.; Headman, Z. C.; Heemstra, J. M. High-Throughput Enantiopurity Analysis Using Enantiomeric DNA-Based Sensors. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (12), 4198–4206.
- (173) Tan, Z.; Feagin, T. A.; Heemstra, J. M. Temporal Control of Aptamer Biosensors Using Covalent Self-Caging To Shift Equilibrium. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (20), 6328–6331.
- (174) Osypova, A.; Thakar, D.; Dejeu, J.; Bonnet, H.; Van der Heyden, A.; Dubacheva, G. V.; Richter, R. P.; Defrancq, E.; Spinelli, N.; Coche-Guérente, L.; Labbé, P. Sensor Based on Aptamer Folding to Detect Low-Molecular Weight Analytes. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (15), 7566–7574.
- (175) Perrier, S.; Bouilloud, P.; De Oliveira Coelho, G.; Henry, M.; Peyrin, E. Small Molecule Aptamer Assays Based on Fluorescence Anisotropy Signal-Enhancer Oligonucleotides. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *82*, 155–161.
- (176) Challier, L.; Mavré, F.; Moreau, J.; Fave, C.; Schöllhorn, B.; Marchal, D.; Peyrin, E.; Noël, V.; Limoges, B. Simple and Highly Enantioselective Electrochemical Aptamer-Based Binding Assay for Trace Detection of Chiral Compounds. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (12), 5415–5420.
- (177) Li, Y.; Liu, J. Aptamer-Based Strategies for Recognizing Adenine, Adenosine, ATP and Related Compounds. *Analyst* **2020**, *145* (21), 6753–6768.
- (178) 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. *Chem. Biol* **1997**, *4* (11), 817–832.
- (179) 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. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25* (7), 1652–1657.
- (180) Li, Y.; Zhao, Q. Aptamer Structure Switch Fluorescence Anisotropy Assay for Small Molecules Using Streptavidin as an Effective Signal Amplifier Based on Proximity Effect. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (11), 7379–7384.
- (181) Jia, Y.; Zhou, G.; Liu, P.; Li, Z.; Yu, B. Recent Development of Aptamer Sensors for the Quantification of Aflatoxin B1. *Appl. Sci.* **2019**, *9* (11), 2364.
- (182) Le, L. C.; Cruz-Aguado, J. A.; Penner, G. A. Dna Ligands for Aflatoxin and Zearalenone. WO2011020198A1, February 24, 2011. <https://patents.google.com/patent/WO2011020198A1/en> (accessed 2023-06-12).

- (183) Sun, L.; Zhao, Q. Direct Fluorescence Anisotropy Approach for Aflatoxin B1 Detection and Affinity Binding Study by Using Single Tetramethylrhodamine Labeled Aptamer. *Talanta* **2018**, *189*, 442–450.
- (184) Li, Y.; Zhao, Q. Aptamer Structure Switch Fluorescence Anisotropy Assay for Aflatoxin B1 Using Tetramethylrhodamine-Guanine Interaction to Enhance Signal Change. *Chin Chem Lett.* **2020**, S1001841720300309.
- (185) Wang, C.; Li, Y.; Zhao, Q. A Signal-on Electrochemical Aptasensor for Rapid Detection of Aflatoxin B1 Based on Competition with Complementary DNA. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *144*, 111641.
- (186) Li, Y.; Sun, L.; Zhao, Q. Aptamer-Structure Switch Coupled with Horseradish Peroxidase Labeling on a Microplate for the Sensitive Detection of Small Molecules. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (4), 2615–2619.
- (187) Lv, Z.; Chen, A.; Liu, J.; Guan, Z.; Zhou, Y.; Xu, S.; Yang, S.; Li, C. A Simple and Sensitive Approach for Ochratoxin A Detection Using a Label-Free Fluorescent Aptasensor. *PLoS ONE* **2014**, *9* (1).
- (188) Xu, G.; Zhao, J.; Yu, H.; Wang, C.; Huang, Y.; Zhao, Q.; Zhou, X.; Li, C.; Liu, M. Structural Insights into the Mechanism of High-Affinity Binding of Ochratoxin A by a DNA Aptamer. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144* (17), 7731–7740.
- (189) Fadock, K. L.; Manderville, R. A. DNA Aptamer–Target Binding Motif Revealed Using a Fluorescent Guanine Probe: Implications for Food Toxin Detection. *ACS Omega* **2017**, *2* (8), 4955–4963.
- (190) Liu, Y.; Zhao, Q. Direct Fluorescence Anisotropy Assay for Cocaine Using Tetramethylrhodamine-Labeled Aptamer. *Anal Bioanal Chem* **2017**, *409* (16), 3993–4000.
- (191) Neves, M. A. D.; Reinstein, O.; Saad, M.; Johnson, P. E. Defining the Secondary Structural Requirements of a Cocaine-Binding Aptamer by a Thermodynamic and Mutation Study. *Biophys. Chem.* **2010**, *153* (1), 9–16.
- (192) Neves, M. A. D.; Shoara, A. A.; Reinstein, O.; Abbasi Borhani, O.; Martin, T. R.; Johnson, P. E. Optimizing Stem Length To Improve Ligand Selectivity in a Structure-Switching Cocaine-Binding Aptamer. *ACS Sens.* **2017**, *2* (10), 1539–1545.
- (193) Neves, M. A. D.; Slavkovic, S.; Churcher, Z. R.; Johnson, P. E. Salt-Mediated Two-Site Ligand Binding by the Cocaine-Binding Aptamer. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45* (3), 1041–1048.
- (194) Slavkovic, S.; Altunisik, M.; Reinstein, O.; Johnson, P. E. Structure–Affinity Relationship of the Cocaine-Binding Aptamer with Quinine Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (10), 2593–2597.
- (195) Shoara, A.; Slavkovic, S.; Donaldson, L.; Johnson, P. Analysis of the Interaction between the Cocaine-Binding Aptamer and Its Ligands Using Fluorescence Spectroscopy. *Can. J. Chem.* **2017**, *95*.

- (196) Sassolas, A.; Marty, J. L. Biocapteurs au service du diagnostic médical. *Techniques de l'ingénieur*. 2013.
- (197) Vidic, J. Application des biocapteurs pour la détection des pathogènes. *Techniques de l'ingénieur*. 2016.
- (198) Malhotra, S.; Verma, A.; Tyagi, N.; Kumar, V. Biosensors: Principle, Types and Applications. *Int. J. Adv. Res. Innov. Ideas Educ* **2017**, *3* (2).
- (199) Clark Jr., L. C.; Lyons, C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102* (1), 29–45.
- (200) Laurence, L.; Marc, D. Immunoanalyse et Toxicologie. *Annales de Toxicologie Analytique* **2009**, *21*(1), 1–2.
- (201) Prante, M.; Segal, E.; Scheper, T.; Bahnemann, J.; Walter, J. Aptasensors for Point-of-Care Detection of Small Molecules. *Biosensors* **2020**, *10* (9), 108.
- (202) Suzuki, C.; Ueda, H.; Mahoney, W.; Nagamune, T. Open Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Quantitation of Small Haptens. *Analytical Biochemistry* **2000**, *286* (2), 238–246.
- (203) Goux, E.; Lisi, S.; Ravelet, C.; Durand, G.; Fiore, E.; Dausse, E.; Toulmé, J.-J.; Peyrin, E. An Improved Design of the Kissing Complex-Based Aptasensor for the Detection of Adenosine. *Anal Bioanal Chem* **2015**, *407* (21), 6515–6524.
- (204) Liu, A.; Anfossi, L.; Shen, L.; Li, C.; Wang, X. Non-Competitive Immunoassay for Low-Molecular-Weight Contaminant Detection in Food, Feed and Agricultural Products: A Mini-Review. *Trends Food Sci Technol* **2018**, *71*, 181–187.
- (205) Salvador, J.-P.; Vilaplana, L.; Marco, M.-P. Nanobody: Outstanding Features for Diagnostic and Therapeutic Applications. *Anal Bioanal Chem* **2019**, *411* (9), 1703–1713.
- (206) Kleinjung, F.; Klussmann, S.; Erdmann, V. A.; Scheller, F. W.; Fürste, J. P.; Bier, F. F. High-Affinity RNA as a Recognition Element in a Biosensor. *Anal. Chem.* **1998**, *70* (2), 328–331.
- (207) Han, K.; Liang, Z.; Zhou, N. Design Strategies for Aptamer-Based Biosensors. *Sensors* **2010**, *10* (5), 4541–4557.
- (208) Li, F.; Yu, Z.; Han, X.; Lai, R. Y. Electrochemical Aptamer-Based Sensors for Food and Water Analysis: A Review. *Analytica Chimica Acta* **2019**, *1051*, 1–23.
- (209) Xiang, W.; Lv, Q.; Shi, H.; Xie, B.; Gao, L. Aptamer-Based Biosensor for Detecting Carcinoembryonic Antigen. *Talanta* **2020**, *214*, 120716.
- (210) Kudłak, B.; Wiczerzak, M. Aptamer Based Tools for Environmental and Therapeutic Monitoring: A Review of Developments, Applications, Future Perspectives. *Crit Rev Environ Sci Technol* **2020**, *50* (8), 816–867.
- (211) Eivazzadeh-Keihan, R.; Pashazadeh-Panahi, P.; Baradaran, B.; Maleki, A.; Hejazi, M.; Mokhtarzadeh, A.; de la Guardia, M. Recent Advances on Nanomaterial Based Electrochemical

- and Optical Aptasensors for Detection of Cancer Biomarkers. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2018**, *100*, 103–115.
- (212) Zhang, X.; Wang, X.; Yang, Q.; Jiang, X.; Li, Y.; Zhao, J.; Qu, K. Conductometric Sensor for Viable Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus Based on Magnetic Analyte Separation via Aptamer. *Microchim Acta* **2019**, *187* (1), 43.
- (213) Malecka, K.; Mikula, E.; Ferapontova, E. E. Design Strategies for Electrochemical Aptasensors for Cancer Diagnostic Devices. *Sensors* **2021**, *21* (3), 736.
- (214) Ziolkowski, R.; Jarczewska, M.; Górski, Ł.; Malinowska, E. From Small Molecules toward Whole Cells Detection: Application of Electrochemical Aptasensors in Modern Medical Diagnostics. *Sensors* **2021**, *21* (3), 724.
- (215) Cheng, A. K. H.; Sen, D.; Yu, H.-Z. Design and Testing of Aptamer-Based Electrochemical Biosensors for Proteins and Small Molecules. *Bioelectrochemistry* **2009**, *77* (1), 1–12.
- (216) Nguyen, V.-T.; Kwon, Y. S.; Gu, M. B. Aptamer-Based Environmental Biosensors for Small Molecule Contaminants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *45*, 15–23.
- (217) Alkhamis, O.; Canoura, J.; Yu, H.; Liu, Y.; Xiao, Y. Innovative Engineering and Sensing Strategies for Aptamer-Based Small-Molecule Detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *121*, 115699.
- (218) Nakatsuka, N.; Yang, K.-A.; Abendroth, J. M.; Cheung, K. M.; Xu, X.; Yang, H.; Zhao, C.; Zhu, B.; Rim, Y. S.; Yang, Y.; Weiss, P. S.; Stojanović, M. N.; Andrews, A. M. Aptamer–Field-Effect Transistors Overcome Debye Length Limitations for Small-Molecule Sensing. *Science* **2018**, *362* (6412), 319–324.
- (219) Chen, X.; Liu, Y.; Fang, X.; Li, Z.; Pu, H.; Chang, J.; Chen, J.; Mao, S. Ultratrace Antibiotic Sensing Using Aptamer/Graphene-Based Field-Effect Transistors. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *126*, 664–671.
- (220) Wang, B.; Zhao, C.; Wang, Z.; Yang, K.-A.; Cheng, X.; Liu, W.; Yu, W.; Lin, S.; Zhao, Y.; Cheung, K. M.; Lin, H.; Hojaiji, H.; Weiss, P. S.; Stojanović, M. N.; Tomiyama, A. J.; Andrews, A. M.; Emaminejad, S. Wearable Aptamer-Field-Effect Transistor Sensing System for Noninvasive Cortisol Monitoring. *Sci. Adv.* **2022**, *8* (1).
- (221) Akgönüllü, S.; Özgür, E.; Denizli, A. Quartz Crystal Microbalance-Based Aptasensors for Medical Diagnosis. *Micromachines* **2022**, *13* (9), 1441.
- (222) Cengiz Özalp, V. Acoustic Quantification of ATP Using a Quartz Crystal Microbalance with Dissipation. *Analyst* **2011**, *136* (23), 5046–5050.
- (223) Zheng, B.; Cheng, S.; Liu, W.; Lam, M. H.-W.; Liang, H. Small Organic Molecules Detection Based on Aptamer-Modified Gold Nanoparticles-Enhanced Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Biosensor. *Anal. Biochem.* **2013**, *438* (2), 144–149.
- (224) Dong, Z.-M.; Zhao, G.-C. A Theophylline Quartz Crystal Microbalance Biosensor Based on Recognition of RNA Aptamer and Amplification of Signal. *Analyst* **2013**, *138* (8), 2456–2462.

- (225) Yuan, M.; Song, Z.; Fei, J.; Wang, X.; Xu, F.; Cao, H.; Yu, J. Aptasensor for Lead(II) Based on the Use of a Quartz Crystal Microbalance Modified with Gold Nanoparticles. *Microchim Acta* **2017**, *184* (5), 1397–1403.
- (226) Dong, Z.-M.; Zhao, G.-C. Quartz Crystal Microbalance Aptasensor for Sensitive Detection of Mercury(II) Based on Signal Amplification with Gold Nanoparticles. *Sensors* **2012**, *12* (6), 7080–7094.
- (227) Yang, Y.; Yang, L.; Ma, Y.; Wang, X.; Zhang, J.; Bai, B.; Yu, L.; Guo, C.; Zhang, F.; Qin, S. A Novel Metal–Organic Frameworks Composite-Based Label-Free Point-of-Care Quartz Crystal Microbalance Aptasensing Platform for Tetracycline Detection. *Food Chem.* **2022**, *392*, 133302.
- (228) Hou, H.; Bai, X.; Xing, C.; Gu, N.; Zhang, B.; Tang, J. Aptamer-Based Cantilever Array Sensors for Oxytetracycline Detection. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (4), 2010–2014.
- (229) Bai, X.; Hou, H.; Zhang, B.; Tang, J. Label-Free Detection of Kanamycin Using Aptamer-Based Cantilever Array Sensor. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *56*, 112–116.
- (230) Chen, X.; Bai, X.; Li, H.; Zhang, B. Aptamer-Based Microcantilever Array Biosensor for Detection of Fumonisin B-1. *RSC Adv.* **2015**, *5* (45), 35448–35452.
- (231) Wang, Y.; Rao, D.; Wu, X.; Zhang, Q.; Wu, S. Aptamer-Based Microcantilever-Array Biosensor for Ultra-Sensitive and Rapid Detection of Okadaic Acid. *Microchem. J.* **2021**, *160*, 105644.
- (232) Zhao, R.; Jia, D.; Wen, Y.; Yu, X. Cantilever-Based Aptasensor for Trace Level Detection of Nerve Agent Simulant in Aqueous Matrices. *Sens. Actuators B: Chem.* **2017**, *238*, 1231–1239.
- (233) Li, C.; Zhang, G.; Wu, S.; Zhang, Q. Aptamer-Based Microcantilever-Array Biosensor for Profenofos Detection. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1020*, 116–122.
- (234) Xie, M.; Zhao, F.; Zhang, Y.; Xiong, Y.; Han, S. Recent Advances in Aptamer-Based Optical and Electrochemical Biosensors for Detection of Pesticides and Veterinary Drugs. *Food Control* **2022**, *131*, 108399.
- (235) Feng, C.; Dai, S.; Wang, L. Optical Aptasensors for Quantitative Detection of Small Biomolecules: A Review. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *59*, 64–74.
- (236) Jouanneau, S.; Thouand, G. Biocapteurs pour la surveillance des polluants dans l'environnement. *Techniques de l'ingénieur*. 2019.
- (237) Sun, Y.; Lu, J. Chemiluminescence-Based Aptasensors for Various Target Analytes. *Luminescence* **2018**, *33* (8), 1298–1305.
- (238) Wang, H.-X.; Zhao, Y.-W.; Li, Z.; Liu, B.-S.; Zhang, D. Development and Application of Aptamer-Based Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Sensors in Quantitative Analysis and Biotherapy. *Sensors* **2019**, *19* (17), 3806.
- (239) Muhammad, M.; Huang, Q. A Review of Aptamer-Based SERS Biosensors: Design Strategies and Applications. *Talanta* **2021**, *227*, 122188.

- (240) Chang, C.-C. Recent Advancements in Aptamer-Based Surface Plasmon Resonance Biosensing Strategies. *Biosensors* **2021**, *11* (7), 233.
- (241) Gao, S.; Zheng, X.; Wu, J. A Biolayer Interferometry-Based Competitive Biosensor for Rapid and Sensitive Detection of Saxitoxin. *Sens. Actuators B: Chem.* **2017**, *246*, 169–174.
- (242) Li, J.; Liu, B.; Liu, L.; Zhang, N.; Liao, Y.; Zhao, C.; Cao, M.; Zhong, Y.; Chai, D.; Chen, X.; Zhang, D.; Wang, H.; He, Y.; Li, Z. Fluorescence-Based Aptasensors for Small Molecular Food Contaminants: From Energy Transfer to Optical Polarization. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **2023**, *285*, 121872.
- (243) E. Wang, R.; Zhang, Y.; Cai, J.; Cai, W.; Gao, T. Aptamer-Based Fluorescent Biosensors. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18* (27), 4175–4184.
- (244) Chovelon, B.; Fiore, E.; Faure, P.; Peyrin, E.; Ravelet, C. A Lifetime-Sensitive Fluorescence Anisotropy Probe for DNA-Based Bioassays: The Case of SYBR Green. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *90*, 140–145.
- (245) Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Lakowicz, J. R., Ed.; Springer US: Boston, MA, 2006; pp 27–61.
- (246) Stryer, L. Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler. *Annu Rev Biochem* **1978**, *47*, 819–846.
- (247) Pehlivan, Z. S.; Torabfam, M.; Kurt, H.; Ow-Yang, C.; Hildebrandt, N.; Yüce, M. Aptamer and Nanomaterial Based FRET Biosensors: A Review on Recent Advances (2014–2019). *Microchim Acta* **2019**, *186* (8), 563.
- (248) Zhang, G.; Li, T.; Zhang, J.; Chen, A. A Simple FRET-Based Turn-on Fluorescent Aptasensor for 17 $\beta$ -Estradiol Determination in Environmental Water, Urine and Milk Samples. *Sens. Actuators B: Chem.* **2018**, *273*, 1648–1653.
- (249) Li, Y.; Sun, L.; Zhao, Q. Development of Aptamer Fluorescent Switch Assay for Aflatoxin B1 by Using Fluorescein-Labeled Aptamer and Black Hole Quencher 1-Labeled Complementary DNA. *Anal Bioanal Chem* **2018**, *410* (24), 6269–6277.
- (250) Wang, C.; Li, Y.; Zhou, C.; Zhao, Q. Fluorometric Determination of Aflatoxin B1 Using a Labeled Aptamer and Gold Nanoparticles Modified with a Complementary Sequence Acting as a Quencher. *Microchim Acta* **2019**, *186* (11), 728.
- (251) Nasirian, V.; Chabok, A.; Barati, A.; Rafienia, M.; Arabi, M. S.; Shamsipur, M. Ultrasensitive Aflatoxin B1 Assay Based on FRET from Aptamer Labelled Fluorescent Polymer Dots to Silver Nanoparticles Labeled with Complementary DNA. *Microchim Acta* **2017**, *184* (12), 4655–4662.
- (252) Sharma, A.; Catanante, G.; Hayat, A.; Istamboulie, G.; Ben Rejeb, I.; Bhand, S.; Marty, J. L. Development of Structure Switching Aptamer Assay for Detection of Aflatoxin M1 in Milk Sample. *Talanta* **2016**, *158*, 35–41.

- (253) Chen, L.; Wen, F.; Li, M.; Guo, X.; Li, S.; Zheng, N.; Wang, J. A Simple Aptamer-Based Fluorescent Assay for the Detection of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Infant Rice Cereal. *Food Chem.* **2017**, *215*, 377–382.
- (254) Zhang, J.; Li, Z.; Zhao, S.; Lu, Y. Size-Dependent Modulation of Graphene Oxide–Aptamer Interactions for an Amplified Fluorescence-Based Detection of Aflatoxin B<sub>1</sub> with a Tunable Dynamic Range. *Analyst* **2016**, *141* (13), 4029–4034.
- (255) Sheng, L.; Ren, J.; Miao, Y.; Wang, J.; Wang, E. PVP-Coated Graphene Oxide for Selective Determination of Ochratoxin A via Quenching Fluorescence of Free Aptamer. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26* (8), 3494–3499.
- (256) Zhu, Y.; Cai, Y.; Xu, L.; Zheng, L.; Wang, L.; Qi, B.; Xu, C. Building An Aptamer/Graphene Oxide FRET Biosensor for One-Step Detection of Bisphenol A. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (14), 7492–7496.
- (257) Ha, N.-R.; Jung, I.-P.; La, I.-J.; Jung, H.-S.; Yoon, M.-Y. Ultra-Sensitive Detection of Kanamycin for Food Safety Using a Reduced Graphene Oxide-Based Fluorescent Aptasensor. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 40305.
- (258) Yu, H.; Zhao, Q. Aptamer Molecular Beacon Sensor for Rapid and Sensitive Detection of Ochratoxin A. *Molecules* **2022**, *27* (23), 8267.
- (259) Ueyama, H.; Takagi, M.; Takenaka, S. A Novel Potassium Sensing in Aqueous Media with a Synthetic Oligonucleotide Derivative. Fluorescence Resonance Energy Transfer Associated with Guanine Quartet–Potassium Ion Complex Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (48), 14286–14287.
- (260) Ozaki, H.; Nishihira, A.; Wakabayashi, M.; Kuwahara, M.; Sawai, H. Biomolecular Sensor Based on Fluorescence-Labeled Aptamer. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (16), 4381–4384.
- (261) Jameson, D. M.; Ross, J. A. Fluorescence Polarization/Anisotropy in Diagnostics and Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2685–2708.
- (262) Lea, W. A.; Simeonov, A. Fluorescence Polarization Assays in Small Molecule Screening. *Expert Opin Drug Discov* **2011**, *6* (1), 17–32. <https://doi.org/10.1517/17460441.2011.537322>.
- (263) Mocz, G. Information Content of Fluorescence Polarization and Anisotropy. *J Fluoresc* **2006**, *16* (4), 511–524.
- (264) 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.
- (265) 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.



- (266) 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.
- (267) Lopez, A.; Liu, J. Fluorescence Polarization for Probing DNA Adsorption by Nanomaterials and Fluorophore/DNA Interactions. *Langmuir* **2019**, *35* (30), 9954–9961.
- (268) 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 Anal. Chem.* **2019**, *110*, 401–409.
- (269) Cruz-Aguado, J. A.; Penner, G. Fluorescence Polarization Based Displacement Assay for the Determination of Small Molecules with Aptamers. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (22), 8853–8855.
- (270) Li, Y.; Sun, L.; Zhao, Q. Competitive Fluorescence Anisotropy/Polarization Assay for ATP Using Aptamer as Affinity Ligand and Dye-Labeled ATP as Fluorescence Tracer. *Talanta* **2017**, *174*, 7–13.
- (271) Goux, E.; Lespinasse, Q.; Guieu, V.; Perrier, S.; Ravelet, C.; Fiore, E.; Peyrin, E. Fluorescence Anisotropy-Based Structure-Switching Aptamer Assay Using a Peptide Nucleic Acid (PNA) Probe. *Methods* **2016**, *97*, 69–74.
- (272) 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. *Biophys. J.* **2005**, *88* (5), 3455–3465.
- (273) Sjöback, R.; Nygren, J.; Kubista, M. Absorption and Fluorescence Properties of Fluorescein. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **1995**, *51* (6), L7–L21.
- (274) Liu, L.; Zhao, Q. A Simple Fluorescence Anisotropy Assay for Detection of Bisphenol A Using Fluorescently Labeled Aptamer. *J. Environ. Sci.* **2020**, *97*, 19–24.
- (275) Yu, H.; Zhao, Q. A Sensitive Aptamer Fluorescence Anisotropy Sensor for Cd<sup>2+</sup> Using Affinity-Enhanced Aptamers with Phosphorothioate Modification. *Biosensors* **2022**, *12* (10), 887.
- (276) Ma, P.; Guo, H.; Duan, N.; Ma, X.; Yue, L.; Gu, Q.; Wang, Z. Label Free Structure-Switching Fluorescence Polarization Detection of Chloramphenicol with Truncated Aptamer. *Talanta* **2021**, *230*, 122349.
- (277) Nutiu, R.; Li, Y. Structure-Switching Signaling Aptamers. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (16), 4771–4778.
- (278) Ma, K.; Li, X.; Xu, B.; Tian, W. Label-Free Bioassay with Graphene Oxide-Based Fluorescent Aptasensors: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1188*, 338859.
- (279) Billet, B.; Chovelon, B.; Fiore, E.; Oukacine, F.; Petrillo, M.-A.; Faure, P.; Ravelet, C.; Peyrin, E. Aptamer Switches Regulated by Post-Transition/Transition Metal Ions. *Angew. Chem.* **2021**, *133* (22), 12454–12458.

- (280) 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. *Biosens. Bioelectron.* **2022**, *205*, 114091.
- (281) Précis de Biopathologie Biomnis. *Cadmium*. <https://www.eurofins-biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/CADMIUM.pdf> (accessed 2023-08-01).
- (282) Précis de Biopathologie Biomnis. *Plomb*. <https://www.eurofins-biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/PLOMB.pdf> (accessed 2023-08-01).
- (283) Précis de Biopathologie Biomnis. *Nickel*. <https://www.eurofins-biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/NICKEL.pdf> (accessed 2023-08-01).
- (284) Précis de Biopathologie Biomnis. *Cobalt*. <https://www.eurofins-biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/COBALT.pdf> (accessed 2023-08-01).
- (285) Chen, Z.; Luo, H.; Gubu, A.; Yu, S.; Zhang, H.; Dai, H.; Zhang, Y.; Zhang, B.; Ma, Y.; Lu, A.; Zhang, G. Chemically Modified Aptamers for Improving Binding Affinity to the Target Proteins via Enhanced Non-Covalent Bonding. *Front. Cell Dev. Biol.* **2023**, *11*.
- (286) Saran, R.; Huang, Z.; Liu, J. Phosphorothioate Nucleic Acids for Probing Metal Binding, Biosensing and Nanotechnology. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *428*, 213624.
- (287) Précis de Biopathologie Biomnis. *Zinc*. <https://www.eurofins-biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/ZINC.pdf> (accessed 2023-09-14).
- (288) Précis de Biopathologie Biomnis. *Manganèse*. <https://www.eurofins-biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/MANGANESE.pdf> (accessed 2023-09-14).
- (289) Nazarenko, I. Effect of Primary and Secondary Structure of Oligodeoxyribonucleotides on the Fluorescent Properties of Conjugated Dyes. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (9), 2089–2195.



# Annexes

## Annexe 1. Bilan de mon parcours et de mes contributions académiques

La présente thèse a été effectuée dans le cadre de mon internat en pharmacie, plus précisément du parcours IPR (Innovation Pharmaceutique et Recherche). Dans ce contexte, j'avais un poste bi-appartenant, avec une activité au DPM ainsi qu'une activité au CHU Grenoble Alpes (CHUGA), au sein du secteur des éléments traces à l'Institut de Biologie et de Pathologie (IBP).

Une thèse d'exercice a été rédigée en parallèle de la présente thèse, dont le sujet s'intitule « Les aptamères au service du diagnostic biologique : développement d'un essai avec détection par ICP-MS. ».

### 1. Publications :

- Billet, B.; Chovelon, B.; Fiore, E.; Oukacine, F.; Petrillo, M.-A.; Faure, P.; Ravelet, C.; Peyrin, E. Aptamer Switches Regulated by Post-Transition/Transition Metal Ions. *Angewandte Chemie* **2021**, 133 (22), 12454–12458.
- 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.
- Billet, B.; Choissard, L.; Faure, P.; Guicherd, D.; Cussigh, E.; Peyrin, E.; Ravelet, C.; Chovelon, B. Stability of Fecal Calprotectin Extracts Using the Diasorin® Kit. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* **2023**.
- Billet, B.; Chovelon, B.; McConnell, E. M.; André, D.; Puillet-Anselme, L.; Fiore, E.; Faure, P.; Ravelet, C.; DeRosa, M. C.; Peyrin, E. Iodinated Organic Molecule as Tag for Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry Aptamer Assays. *Talanta* **2024**, 267, 125107.
- Une revue de la littérature intitulée « Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry as Signaling Approach in Nucleic Acid-based Bioassays » est en cours de rédaction.

## 2. Communications :

<b>Date</b>	<b>Lieu</b>	<b>Type</b>	<b>Titre</b>
18 Juin 2021	Journée scientifique de l'AESAP (online event).	Présentation orale. 3 <sup>e</sup> prix du jury.	"Développement d'un commutateur moléculaire à base d'aptamère régulé par les ions métalliques de transition/post-transition"
1 <sup>er</sup> Juillet 2021	Jeudi de la Recherche de l'IBP. (Grenoble, France)	Présentation orale.	"Développement d'un commutateur moléculaire à base d'aptamère régulé par les ions métalliques de transition/post-transition"
22 Octobre 2021	GDR Chemobiology. (Grenoble, France)	Présentation orale « flash-talk ».	"Aptamer Switches Regulated by Post-Transition/Transition Metal ions"
4 et 5 Avril 2022	Congrès international « Aptamers 2022 ». (Oxford, UK).	Présentation orale et poster	"Aptamer Switches Regulated by Post-Transition/Transition Metal ions"
3 Juin 2022	Journée Scientifique du Médicament. (Grenoble, France).	Présentation orale « flash-talk ».	"Utilisation d'un marqueur organique iodé pour le développement d'un aptaessai avec détection par ICP-MS"
23 Juin 2022	Journée des Doctorants de l'EDCSV. (Grenoble, France).	Poster.	"Aptamer Switches Regulated by Post-Transition/Transition Metal ions"
27 Juin 2022	Congrès « 4th International Symposium on Advances in Pharmaceutical Analysis » (online event).	Présentation orale	"Iodinated organic molecule as effective label for developing an aptaassay using ICP-MS detection"
5, 6 et 7 Juin 2023	Congrès « International Oligonucleotides and Peptides Conference ». (Milan, Italie).	Présentation orale « flash-talk » et poster.	"Use of metal ions for the development of aptamer-based optical biosensors for small molecules detection"

### 3. Formations et enseignement :

<b>Titre de la formation</b>	<b>Type</b>	<b>Date</b>	<b>Nombre d'heures</b>
Entrer dans la communauté des chercheurs – 180 minutes pour éviter le plagiat.	Formation EDCSV	04/05/2021	4h en formation transversale
Évaluer à l'aide de grilles critériées	Formation EDCSV	04/06/2021	4h en insertion professionnelle
MOOC Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche	Formation EDCSV	Avril et Mai 2021	15h en formation transversale (éthique)
MOOC Rédiger et publier un article scientifique	Formation hors-catalogue	Juillet 2021	20h en formation transversale
UE Management de la qualité	Formation hors-catalogue	Mars à Juin 2021	63h en formation scientifique (cours de 3eme cycle)
Co-encadrement de TP « Analyse de protéines » à destination des étudiants de L2 Biotechnologies	Formation hors-catalogue (enseignement)	14/04/2021 15/04/2021 17/05/2021	30h effectuées, 10h comptabilisées en insertion professionnelle
Mobilisation vers l'emploi	Formation EDCSV	28/09/2021 29/09/2021 04/10/2021	21h en insertion professionnelle
Jeudi de la Sécurité : risque chimique	Formation EDCSV	25/11/2021	2h en formation transversale
Méthodologie des plans d'expérience	Formation EDCSV	13/01/2022 14/01/2022	16h en formation scientifique
Co-encadrement de TP « Analyse de protéines » à destination des étudiants de L2 Biotechnologies	Formation hors-catalogue (enseignement)	Du 11/04/2022 au 14/04/2022	26h effectuées, 9h comptabilisées en insertion professionnelle
UE Recherche Biomédicale, Recherche Thérapeutique	Formation hors-catalogue	Juin à Octobre 2022	30h
TD de diabétologie à destination des étudiants de L2 Biotechnologies	Formation hors-catalogue (enseignement)	Février 2023	5h30

#### 4. Collaborations :

Pendant l'année 2021-2022, une collaboration a été établie avec le LSABM (Laboratoire Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation) de l'ESPCI (École supérieure de physique et de chimie industrielles) à Paris. Des expériences complémentaires ont été réalisées dans le cadre des travaux de thèse de Fanny Gignac (« Développement de supports solides fonctionnalisés par des aptamères pour l'analyse d'ions présents à l'état de trace dans des échantillons complexes »), en utilisant notre méthode développée en anisotropie de fluorescence (Cf. article n°1). L'objectif de ces expériences était d'examiner l'affinité et la spécificité d'aptamères ciblant les ions métalliques  $Pb^{2+}$  et  $Cd^{2+}$ .

**Annexe 2.** Autorisation de l'éditeur John Wiley & Sons pour republier l'article n°1 dans le présent manuscrit.

### Angewandte Chemie

Article: Aptamer Switches Regulated by Post-Transition/Transition Metal Ions

#### GENERAL INFORMATION

Request ID	600135763	Request Date	06 Sep 2023
Request Status	Accepted	Price	0,00 EUR 

**Annexe 3.** Autorisation de l'éditeur Elsevier pour republier l'article n°2 dans le présent manuscrit.



Detection of small molecules by fluorescence intensity using single dye labeled aptamers and quencher transition metal ions

Author: Blandine Billet, Benoit Chovelon, Emmanuelle Fiore, Patrice Faure, Corinne Ravelet, Eric Peyrin

Publication: Biosensors and Bioelectronics

Publisher: Elsevier

Date: 1 June 2022

© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

## **Serment doctoral d'intégrité scientifique**

« En présence de mes pairs.

Parvenue à l'issue de mon doctorat en Sciences du Médicament, et ayant ainsi pratiqué, dans ma quête du savoir, l'exercice d'une recherche scientifique exigeante, en cultivant la rigueur intellectuelle, la réflexivité éthique et dans le respect des principes de l'intégrité scientifique, je m'engage, pour ce qui dépendra de moi, dans la suite de ma carrière professionnelle quel qu'en soit le secteur ou le domaine d'activité, à maintenir une conduite intègre dans mon rapport au savoir, mes méthodes et mes résultats. »





## **Utilisation des ions métalliques pour le développement de biocapteurs optiques à base d'aptamères dédiés aux petites molécules**

### **Résumé :**

L'un des enjeux actuels dans le domaine de l'analyse biomédicale, pharmaceutique, agro-alimentaire et environnementale réside dans la mise au point de méthodes performantes, fiables, peu onéreuses et utilisables sur le terrain, permettant la détection rapide de petites molécules telles que des toxines, des médicaments ou des pesticides. Les biocapteurs sont des dispositifs présentant les qualités recherchées pour répondre aux besoins sociétaux. Face aux limites que présentent les anticorps pour la reconnaissance de petits analytes, l'utilisation d'aptamères, des oligonucléotides synthétiques possédant une affinité et une spécificité élevée envers une cible donnée, constitue une alternative prometteuse. L'objectif de ma thèse a été de développer des méthodes optiques en phase homogène, en exploitant les propriétés des ions métalliques de transition et post-transition en tant qu'éléments de commutation structurale. Deux aptacapteurs ont ainsi été conçus, reposant soit sur des variations de mobilité locale d'un fluorophore par des modifications d'interactions électrostatiques, soit sur des changements d'intensité de fluorescence induits par un mécanisme de quenching. Un troisième aptacapteur ayant pour objectif d'améliorer certaines caractéristiques des deux précédents est en cours de développement. Des applications dans les secteurs biomédicaux et hospitaliers pour le dosage de biomarqueurs sont escomptées.

**Mots-clés :** Aptamère ; petites molécules ; ions métalliques ; fluorescence ; biocapteur ; commutation.

## **Use of metal ions for the development of aptamer-based optical biosensors for small molecules detection**

### **Abstract :**

The development of high-performance, trustworthy, affordable and on-site useable methods for the rapid detection of small molecules such as toxins, drugs or pesticides represents one of the main challenges in the biomedical, pharmaceutical, food-processing and environmental areas. Devices called biosensors have the qualities required to meet societal needs. Aptamers, defined as synthetic oligonucleotides with high affinity and specificity towards a particular target, offer a promising alternative to antibodies given their limitations for small analytes recognition. The aim of my thesis was to develop optical homogeneous-phase methods, exploiting the properties of transition and post-transition metal ions as structural switching elements. Two aptasensors have been designed, based either on changes in electrostatic interactions that affect a fluorophore's local mobility, or on fluorescence intensity modifications induced by a quenching mechanism. A third one is currently under development, with the aim of improving some features of the previous two. Further applications for biomarkers detection in the biomedical and healthcare sectors are expected.

**Key words :** Aptamer ; small molecules ; metal ions ; fluorescence ; biosensor ; switching.