



HAL
open science

Développement de supports solides fonctionnalisés par des aptamères pour l'analyse d'ions présents à l'état de trace dans des échantillons complexes

Fanny Gignac

► **To cite this version:**

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. Chimie analytique. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS522 . tel-04770573

HAL Id: tel-04770573

<https://theses.hal.science/tel-04770573v1>

Submitted on 7 Nov 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.

Sorbonne Université

École doctorale 388

LSABM - CBI / ESPCI

Développement de supports solides fonctionnalisés par des aptamères pour l'analyse d'ions présents à l'état de trace dans des échantillons complexes

Par Fanny Gignac

Thèse de doctorat de Chimie Analytique

Dirigée par Mme Valérie Pichon (Pr)

Présentée et soutenue publiquement le 6 novembre 2023

Devant un jury composé de :

Mme Agnès Hagège, Chargée de Recherche CNRS, HDR, ISA, Lyon	Rapporteuse
Mr Marc Hebrant, Professeur, LCPME, Université de Lorraine	Rapporteur
Mr Eric Peyrin, Professeur, DPM, Université de Grenoble Alpes	Président du jury
Mr Ludovic Bellot-Gurlet, Professeur, MONARIS, Sorbonne Université	Examineur
Mme Valérie Pichon, Professeure, Sorbonne-Université	Directrice de thèse
Mme Nathalie Delaunay, Chargée de Recherche CNRS, HDR, ESPCI Paris	Co-encadrante

UMR Chimie, Biologie et Innovation 8231 CNRS-ESPCI Paris PSL
Laboratoire Sciences Analytiques, Bioanalytiques et Miniaturisation
Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la ville de Paris (ESPCI Paris PSL)
10 Rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements au Docteur Agnès Hagège, ainsi qu'au Professeur Marc Hebrant pour avoir accepté de juger la qualité de mes travaux en tant que rapporteurs et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit. Mes remerciements vont également au Professeur Ludovic Bellot-Gurlet et au Professeur Eric Peyrin pour avoir accepté d'examiner ce manuscrit.

Mes remerciements vont ensuite à ma directrice de thèse, le Professeur Valérie Pichon ainsi qu'à mon encadrante, le Docteur Nathalie Delaunay pour m'avoir offert l'opportunité de mener à bien ce projet de thèse. Leur disponibilité malgré un emploi du temps chargé a été d'un grand soutien. Merci pour ces trois années de thèse, pour vos précieux conseils ainsi que pour vos encouragements lorsque mon manque de confiance en soi se faisait ressentir. Et enfin merci pour ces bons moments passés en congrès notamment, cela me rappelle encore une fois que la thèse est avant tout un projet commun et humain.

Je remercie tous les permanents du laboratoire pour leur gentillesse et l'aide que chacun d'eux a pu m'apporter au cours de ces trois années. Merci à Audrey pour m'avoir aiguillée sur le greffage des aptamères ainsi qu'à Jérôme pour son aide sur le traitement des ajouts dosés. Merci également à Christophe pour sa gentillesse et sa bonne humeur et désolée de ne pas toujours comprendre tes blagues d'une si grande qualité.

Je remercie très chaleureusement tous les doctorants du laboratoire, cette thèse n'aurait pas été la même sans vous ! Merci aux GC-girls, Elsa et Agathe, pour nos belles discussions. Merci à Laetitia pour nos partages de galères ainsi qu'à Lorenzo pour son oreille attentive. Merci à Chloé avec qui j'ai partagé, le temps de son stage, les déboires du travail sur le cadmium. Merci à Nour, le soutien indéfectible de journées un peu longues au labo. Un grand merci à Pauline, alias Robin, la meilleure acolyte de thèse, merci d'avoir été d'un grand soutien pour moi ainsi que pour avoir joué le rôle de correcteur orthographique, ce manuscrit n'aurait pas été le même sans toi. Merci à Pierre, alias cailloux, pour ta bonne humeur permettant d'apaiser mon stress, ton partage de bureau ainsi que pour m'avoir laissé ranger ton bureau afin de satisfaire mon côté maniaque. Merci à Marine et Thomas, avec qui j'ai pu partager mes déboires mais aussi de super vacances au ski. Et enfin merci à Cécile, Florine, Clément, Romain, Pengchao, Anastasia et Khirredine.

Je tiens à remercier Alice, qui a travaillé en tant que stagiaire sur le développement de l'aptamère cuivre. Son enthousiasme et son implication dans le sujet ont été d'une grande aide. Bon courage pour ta thèse !

Un immense merci à mes amies qui m'accompagnent depuis tant d'années, Nolwenn, Karine, Ophélie, Camille et Céline. Merci à toute ma famille, mes parents, frère et sœurs pour leur soutien lors de ces longues années d'études, chargées en stress ! Une pensée à ma nièce et mon neveu qui m'ont permis de me vider la tête dans les moments où j'en avais besoin.

Et enfin, un immense merci à ma moitié, Stéphane, sans qui rien de tout ça n'aurait été possible. Merci pour ton soutien sans faille ainsi que pour ton fameux « mais si ça va allez ».

Avertissement au lecteur

Cette thèse est rédigée comme une succession de chapitres dont certains sont construits sur la structure d'articles (publiés ou soumis) pouvant se lire indépendamment. Ceci engendre des changements entre la langue française et anglaise ainsi que quelques redondances.

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	11
LISTE DES ABRÉVIATIONS	13
INTRODUCTION GÉNÉRALE	17
Chapitre I - Etat de l'art de l'analyse d'ions métalliques en milieux complexes	23
I.1. Présentation des ions étudiés	23
I.1.1. Le Cadmium, origine, utilisation et toxicité	23
I.1.2. Le Plomb, origine, utilisation et toxicité	24
I.1.2. Le Cuivre, description de l'oligo-élément et toxicité	24
I.1.3. Réglementation et normes	25
I.2. État de l'art des méthodes analytiques de quantification des ions métalliques	26
I.2.1. Méthodes spectroscopiques	27
I.2.2. Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif	28
I.2.3. Comparaison et limitations des techniques actuelles de quantification	29
I.3. Etat de l'art de l'extraction sur phase solide appliquée aux ions métalliques.....	30
I.3.1. L'extraction sur phase solide	30
I.3.1.1. Principe.....	31
I.3.1.2. Paramètres clés de l'extraction sur phase solide.....	32
I.3.1.2.1. Volume de fin de fixation	32
I.3.1.2.2. Capacité	34
I.3.2. Supports conventionnels pour l'extraction d'ions et leurs limites.....	35
I.3.2.1. Supports organiques	35
I.3.2.2. Supports inorganiques	37
I.3.2.3. Bio-supports	38
I.3.2.4. Limites des supports conventionnels.....	39
I.3.3. Supports spécifiques	40
I.4. Conclusion.....	45
Chapitre II - Les aptamères, état de l'art et applications à l'analyse d'ions métalliques	49
II.1. Généralités sur les aptamères et leurs applications pour les molécules	49

II.1.1 Structure des aptamères.....	49
II.1.1.1. Structure primaire	49
II.1.1.2. Structure tridimensionnelle	51
II.1.2. Fixation d'un aptamère à sa cible	53
II.1.3. Processus d'identification d'aptamères spécifiques : le procédé SELEX	55
II.1.3.1 Principe général.....	55
II.1.3.2. Choix de la bibliothèque d'oligonucléotides.....	56
II.1.3.3. Sélection des séquences à forte affinité pour la cible	57
II.1.3.4. Amplification des séquences.....	58
II.1.3.5. Spécificité des protocoles SELEX ayant pour cible des ions métalliques.....	61
II.1.3.6. Modélisation de la structure des séquences	62
II.2. Développement d'oligoadsorbants spécifiques aux molécules	62
II.2.1. Choix de la séquence d'aptamère.....	63
II.2.2. Greffage de la séquence	65
II.2.2.1 Choix du support de greffage et de sa fonctionnalisation	65
II.2.2.2 Choix du bras espaceur	68
II.2.2.3. Mesure des taux de greffage	68
II.2.3. Paramètres clés de l'oligoextraction de molécules	69
II.2.3.1. Sélectivité et choix du support contrôle	70
II.2.3.2. Optimisation de l'étape d'oligoextraction pour l'analyse de molécules organiques.....	70
II.2.3.5. Régénération / Réutilisation	72
II.2.3.6. Applications des aptamères pour cibler des molécules.....	72
II.3. Utilisation des aptamères ciblant les ions	74
II.3.1. Séquences ciblant Cd(II).....	75
II.3.2. Séquences ciblant Pb(II).....	81
II.3.3. Séquences ciblant Cu(II).....	88
II.4. Conclusion.....	94
Chapitre III - Développement de supports fonctionnalisés par des aptamères pour l'extraction du cadmium d'échantillons de sérum	99
Abstract.....	101
III.1. Introduction	102
III.2. Experimental.....	104
III.2.1. Reagents and samples	104

III.2.2. ICP-MS	104
III.2.3. LC-UV analysis of aptamer	105
III.2.4. Oligosorbent synthesis.....	106
III.2.4. Extraction procedure	106
III.2.4.1. Pure media	106
III.2.4.2. Serum samples	107
III.3. Results and discussion	108
III.3.1. Oligosorbent synthesis and grafting yields.....	108
III.3.2. Selection of the percolation media.....	109
III.3.3. Simulation of aptamer conformations.....	114
III.3.4. Experimental capacity of the oligosorbent.....	115
III.3.5. Specificity of the oligosorbent	116
III.3.6. Oligoextraction of Cd(II) from serum samples.....	117
III.3.7. Conclusions	119
Conclusion du chapitre	121
Chapitre IV - Développement de supports fonctionnalisés par des aptamères pour l'extraction du plomb d'échantillons de sérum	125
Abstract.....	127
IV.1. Introduction.....	128
IV.2. Experimental	130
III.2.1. Reagents and samples	130
IV.2.2. ICP-MS.....	130
IV.2.3. Oligosorbent synthesis	131
IV.2.4. RP-HPLC-UV analysis of aptamer.....	132
IV.2.5. Extraction procedure	132
IV.2.5.1. Pure media	132
IV.2.5.2. Serum samples	133
IV.3. Results and discussion.....	133
IV.3.1. Oligosorbent synthesis and grafting yields.....	133
IV.3.2. Selection of the extraction media	135
IV.3.3. Optimization of the elution conditions	139
IV.3.4. Evaluation of the experimental capacity.....	141
IV.3.5. Specificity of the oligosorbents	142
IV.3.6. Oligoextraction of Pb(II) from serum samples	144

Conclusion.....	145
Conclusion du chapitre et travaux complémentaires	147
Chapitre V - Développement de supports fonctionnalisés par des aptamères pour l'extraction du cuivre d'échantillons de sérum	151
V.1. Sélection des séquences.....	152
V.2. Mesure des taux de greffage.....	155
V.3. Extraction sur phase solide avec les oligoadsorbants synthétisés.....	156
Conclusion	164
CONCLUSION GÉNÉRALE	167
ANNEXES	171
Annexe 1 : Supplementary information - Chapitre III - Article 1.....	171
Annexe 2 : Supplementary information - Chapitre IV - Article 2.....	180
Annexe 3 : Chapitre V - Gamme d'étalonnage des aptamères par chromatographie en phase liquide de paire d'ions couplée à un détecteur UV	188
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....	191
Liste des figures	191
Liste des tableaux	199
RÉFÉRENCES	201

LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

F. Gignac, N. Delaunay, V. Pichon “*Novel oligonucleotide-based sorbent for the selective extraction of cadmium from serum samples*” publié dans Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115771>

F. Gignac, N. Delaunay, V. Pichon “Development of an oligonucleotide-based sorbent for the selective and specific extraction of lead from biological samples” en correction

Communications orales

F. Gignac, N. Delaunay, V. Pichon “Développement de supports solides fonctionnalisés par des aptamères pour l’analyse d’ions présents à l’état de trace dans des échantillons complexes” 2^{ème} école thématique du Club Jeunes de l’AfSep, Pornichet, France, 14-17 juin 2022.

F. Gignac, N. Delaunay, V. Pichon “Development of aptamer-based supports for cadmium ion extraction from complex samples” Congrès Analytics, Nantes, France, 5-8 septembre 2022.

F. Gignac, N. Delaunay, V. Pichon “Développement de supports fonctionnalisés par des aptamères pour l'extraction des ions du cadmium et du plomb d'échantillons complexes” SEP 2023, 15^{ème} Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages de l’AfSep, Paris, France, 28-30 Mars 2023. **Prix de la meilleure communication orale jeune.**

F. Gignac, N. Delaunay, V. Pichon “Développement de supports fonctionnalisés par des aptamères pour l'extraction des ions du cadmium et du plomb d'échantillons complexes” 3^{ème} école thématique du Club Jeunes de l’AfSep, Vichy, France, 30 mai-2 juin 2023.

F. Gignac, N. Delaunay, V. Pichon “Development of aptamer-based supports for cadmium ions extraction from complex samples” Journée des doctorants de l’Ecole Doctorale 388, Paris, France, 15 juin 2023.

Communications par Affiche

F. Gignac, N. Delaunay, V. Pichon “Développement de supports à base d’aptamères pour l’extraction sélective d’ions d’échantillons complexes” SEP 2021, 14^{ème} Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages de l’AfSep, Paris, France, 5-7 octobre 2021

F. Gignac, N. Delaunay, V. Pichon “Development of aptamer-based sorbents for cadmium ion extraction from complex samples” HTC 17, 17th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation technology, Gand, Belgique, 18-20 mai 2022

F. Gignac, N. Delaunay, V. Pichon “Development of innovative oligonucleotide-based supports for the selective extraction of cadmium and lead from serum samples” HPLC 2023, 51th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Dusseldorf, Allemagne, 18-22 Juin 2023.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-Br-PADAP	2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(diéthylamino)phénol (2-(5-Bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol)
AAS	Spectroscopie d'absorption atomique (atomic absorption spectroscopy)
ACN	Acétonitrile (Acetonitrile)
ADN	Acide désoxyribonucléique (Deoxyribonucleic acid)
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire (Complementary Deoxyribonucleic acid)
AFB1	Aflatoxine B1 (Aflatoxin B1)
ARN	Acide ribonucléique (Ribonucleic acid)
ATSDR	Agence du registre des substances toxiques et des maladies (Agency for toxic substances and disease registry)
CE	Electrophorèse capillaire (Capillary electrophoresis)
CNBr	Bromure de cyanogène (Cyanogen Bromide)
CPAAm	Polyacrylamide réticulé (Cross-linked polyacrylamide)
dSPE	extraction sur phase solide en mode dispersif (Dispersive solid phase extraction)
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique (Ethylenediamine tetraacetic acid)
FAAS	Spectroscopie d'absorption atomique à flamme (Flame atomic absorption spectroscopy)
FAM	Fluorescéine (Carboxyfluorescein)
GFAAS	Spectrométrie d'absorption atomique en four graphite (Graphite furnace atomic absorption spectrometry)
GMA	Méthacrylate de glycidyle (Glycidyl methacrylate)
HEPES	acide 2-(4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazinyl)-éthanesulfonique (2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethane-1-sulfonic acid)

ICP-AES	Spectroscopie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy)
ICP-MS	Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (inductively-coupled plasma mass spectrometry)
IIP	Polymères à empreintes ioniques (ion imprinted polymers)
Kd	Constante de dissociation (Dissociation constant)
LOQ	Limite de quantification (limit of quantification)
MES	Acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)
MeTU	Méthylthiourée (Methyl thiourea)
MIP	Polymère à empreinte moléculaire (Molecularly imprinted polymer)
MOF	Polymères de coordination poreux (Metal-organic Framework)
MOPS	Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)
MWCNT	Nanotubes de carbone multi-parois (Multiple Walled Carbon Nanotubes)
NHS	N-hydroxysuccinimide
NIP	Polymère non imprimé (Non-imprinted polymer)
NTA	Acide nitriloacétique (Nitriloacetic acid)
OS	Oligoadsorbant (Oligosorbent)
OTA	Ochratoxine A (Ochratoxin A)
PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	Tampon phosphate salin (Phosphate-buffered saline)
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase chain reaction)
PhTU	Phénylthiourée (Phenyl thiourea)
RP-HPLC	Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (Reversed phase high performance liquid chromatography)

RSD	Ecart-type relatif (Relative standard deviation)
RT-PCR	Reverse transcriptase suivie d'une réaction en chaîne par polymérase
SDS-PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SELEX	Evolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment)
SPE	Extraction sur phase solide (Solid phase extraction)
SWCNT	Nanotubes de carbone à simple paroi (Single Walled Carbon Nanotubes)
TEA	Triéthylamine (Triethylamine)
TEAA	Acétate de Triéthylammonium (Triethylammonium acetate)
TEG	Triéthylène glycol (Triethylene glycol)
TMOS	Orthosilicate de tétraméthyle (Tetramethyl orthosilicate)
TRIM	Triméthacrylate de triméthylolpropane (Trimethylolpropane trimethacrylate)
TRIS	2-Amino-2-hydroxyméthyl-propane-1,3-diol (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)
UV	Ultra-violet (Ultraviolet)
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular endothelial growth factor)
Vf	Volume de fin de fixation (breakthrough volume)
γ-MAPS	3-(triméthoxysilyl) propyl méthacrylate (3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate)

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les ions métalliques constituent aujourd'hui la plus grande partie des éléments chimiques connus. Parmi ces derniers, on retrouve les éléments appartenant à la famille dite des « métaux lourds » dont la densité est considérée comme élevée. On retrouve dans cette liste le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le mercure (Hg), le nickel (Ni), le plomb (Pb), le sélénium (Se) ou encore le zinc (Zn). Ces éléments sont naturellement présents dans l'environnement notamment dans les roches composant le sol. Leur utilisation dans des activités anthropiques telles que l'utilisation de plomb dans l'essence jusque dans les années 2000 [1] entraîne une surexposition de l'Homme à ces métaux. Bien que certains d'entre eux soient considérés comme essentiels au bon fonctionnement du corps humain (comme le cuivre ou le zinc) [2], plusieurs métaux lourds sont nocifs à de très faibles concentrations. Ils peuvent conduire au développement de maladies rénales (Cd ou Cu), osseuses (Cd ou Pb), gastriques (Zn ou Cu), à un retard de développement chez les enfants (Pb) ainsi qu'à des troubles neurologiques (Hg, Se, Pb ou Cu)[3]. Afin de limiter l'exposition des populations à ces ions métalliques, des limites d'admissibilités ont été fixées dans les eaux mais aussi dans de nombreuses denrées alimentaires. De plus, des seuils de normalité ont été déterminés dans le sang du personnel pouvant être exposé dans le milieu professionnel. Les seuils fixés sont de 4 µg/L pour le cadmium [4] et 300-400 µg/L pour le plomb [5]. Afin de pouvoir remonter à une exposition accidentelle, il est donc nécessaire de pouvoir quantifier ces métaux à l'état de trace dans des matrices complexes comme le sang.

L'analyse des métaux est traditionnellement réalisée dans des laboratoires équipés d'instruments spectroscopiques tels que la spectroscopie d'absorption atomique à four graphite (GFAAS), ou encore la spectroscopie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES). Cependant, ces instruments présentent des limites comme le manque de sensibilité ou encore l'impossibilité de réaliser des mesures isotopiques. C'est pour cela que de plus en plus de laboratoires se tournent vers la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) [6]. Cet instrument permet d'atteindre des limites de quantification de l'ordre du ng/L pour certains éléments, ainsi que d'effectuer des mesures isotopiques. Cet instrument est néanmoins très onéreux et nécessite du personnel qualifié. De plus, l'ensemble

de ces instruments est très sensible aux effets de matrices, ce qui nécessite alors de réaliser une étape de traitement de l'échantillon en amont. Une des techniques conventionnelles de traitement de l'échantillon pour les métaux est l'extraction sur phase solide (SPE), qui permet la purification et la préconcentration de l'ion d'intérêt. Néanmoins, les supports classiques utilisés en SPE manquent de spécificité, ce qui entraîne l'extraction simultanée d'autres métaux. Afin de pallier ce manque de spécificité, de nouveaux supports hautement spécifiques sont en cours de développement tels que les réseaux métallo-organiques (MOF) ou encore les polymères à empreintes ioniques (IIP) [7–9]. C'est dans ce cadre que nous sommes intéressés à l'utilisation d'aptamères pour l'extraction de métaux.

Les aptamères sont de simples brins d'ADN ou d'ARN de quelques dizaines à une centaine de bases. Les séquences d'aptamères spécifiques à une cible sont identifiées par un processus appelé évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (SELEX). Ces derniers ont la capacité de reconnaître et de retenir la cible pour laquelle la séquence d'aptamère a été développée. Leur utilisation est déjà reconnue pour l'extraction de molécules organiques telles que la cocaïne [10] ou encore l'ochratoxine A [11]. Concernant les ions métalliques, les aptamères ont très majoritairement été utilisés pour le développement de capteurs, peu d'études portant à ce jour sur le développement de supports d'extraction [12–21]. Or, les capteurs nécessitent une certaine affinité pour le piégeage de la cible à un degré qui peut être moindre que celui nécessaire à sa rétention sur un support d'extraction. Il est aussi possible d'envisager que l'utilisation d'oligoadsorbants hautement spécifiques puisse permettre d'éviter l'utilisation d'instruments de quantification coûteux en les remplaçant par de simples systèmes colorimétriques permettant une mesure fiable de terrain. Cette thèse a eu pour objectif d'investiguer l'utilisation des séquences décrites dans le cadre des capteurs afin de développer des supports solides permettant l'extraction spécifique et sélective d'ions métalliques tels que les ions cadmium, plomb et cuivre.

Dans le chapitre 1, un état de l'art des techniques de quantification des ions cibles a été réalisé. De plus, après une présentation de la SPE ainsi que de ses paramètres clés, un état de l'art présentant les supports conventionnels, leurs limites ainsi que le développement de supports hautement spécifiques a été également réalisé. Le chapitre 2 présente l'état de l'art concernant les aptamères, leur utilisation dans le cadre de l'extraction de molécules organiques ainsi qu'un bilan bibliographique des différentes séquences décrites pour les trois

ions d'intérêt. Le chapitre 3, présenté sous la forme d'un article, traite du développement du support spécifique et sélectif pour l'extraction du cadmium d'échantillons de sérum. Le chapitre 4 présente, sous forme d'un article, le développement des supports spécifiques et sélectifs pour l'extraction du plomb d'échantillons de sérum. Enfin, le chapitre 5 présente le développement en cours du support d'extraction du cuivre.

Chapitre I

**État de l'art de l'analyse d'ions métalliques
en milieux complexes**

Chapitre I - Etat de l'art de l'analyse d'ions métalliques en milieux complexes

I.1. Présentation des ions étudiés

I.1.1. Le Cadmium, origine, utilisation et toxicité

Le cadmium est un métal solide blanc-bleuâtre, mou et très malléable. C'est un métal de transition de numéro atomique 48 et de masse atomique 112,411 u. Il fut découvert vers 1809 par le chimiste suédois Magnus Martin Pontin dans un minerai de carbonate de zinc. Il possède 8 isotopes stables, ^{106}Cd , ^{108}Cd , ^{110}Cd , ^{111}Cd , ^{112}Cd , ^{113}Cd , ^{114}Cd et ^{116}Cd . Il peut être retrouvé sous forme solide (comme dans les minerais) après formation de sels de carbonate ou de phosphate [22]. Le cadmium est retrouvé à l'état naturel dans les minerais rares tels que la greenockite ainsi que dans les minerais de zinc [23]. Il est encore très utilisé dans l'industrie tel que pour la production de pigments (sous sa forme de sulfure de cadmium) [24] ou de batteries (sous forme de sels), ou encore pour la production de métaux non-ferreux [25]. Le cadmium est donc retrouvé ensuite sous forme d'ions dans les eaux, en particulier l'eau potable consommée ainsi que dans celle servant à l'irrigation des sols exploités afin de faire pousser des plantations consommées par la suite par l'homme. A ces premières sources d'exposition au cadmium s'ajoute celle liée à l'inhalation de fumée de cigarettes. Dans ce cas, de l'oxyde de cadmium est inhalé, se dépose dans les poumons et est transféré dans la circulation sanguine [26]. C'est pourquoi les teneurs mesurées dans le sérum de fumeurs sont alors 2 à 5 fois [27] plus élevées que chez les non-fumeurs. Quelle que soit la source d'exposition entraînant l'ingestion et/ou l'inhalation de cadmium, il est peu éliminé dans les urines et s'accumule dans les reins, les os, le foie. Une intoxication chronique au cadmium entraîne alors une atteinte rénale, respiratoire, dentaire et osseuse [28]. Par exemple, une atteinte osseuse endémique au Japon nommée « Itai-Itai » fut reportée à la suite d'une exposition accidentelle provenant d'une mine de cadmium.

I.1.2. Le Plomb, origine, utilisation et toxicité

Le Plomb est un métal gris-terne, ductile, mou et fragile appartenant à la famille des métaux pauvres de numéro atomique 82 et de masse atomique 207,2 u. Il est utilisé depuis l'antiquité, des écritures cunéiformes sumériennes mentionnent notamment son utilisation par les populations locales. Il possède 4 isotopes stables : ^{204}Pb , ^{206}Pb , ^{207}Pb et ^{208}Pb . Le plomb est naturellement présent dans l'écorce terrestre. À partir des années 1920, il fut utilisé en grande quantité sous sa forme tétraéthyle de plomb comme additif de l'essence afin de limiter l'explosion [29]. Ce dernier fut peu à peu abandonné à partir des années 70 après qu'un lien avec la concentration en plomb retrouvé dans le sang humain soit établi [30]. Cette surexploitation a entraîné une contamination des sols, des poussières urbaines ainsi que des cultures. Le plomb fut aussi utilisé dans les peintures sous forme d'oxyde de plomb jusque dans les années 40, ainsi que dans les canalisations comme anti-corrosif ou dans les batteries pour sa bonne conductivité électrique. L'ensemble de ces sources de contamination associé à la non-biodégradation du plomb a entraîné une exposition prolongée des populations à ce métal. Il s'est alors accumulé dans les os, desquels il est relargué dans le sang essentiellement durant les périodes de déminéralisation des os telles que la grossesse, l'allaitement ou encore la post-ménopause [31]. L'intoxication au plomb, appelée saturnisme, touche principalement les enfants qui ingèrent le plomb par mise à la bouche de jouets conçus avec des matériaux contaminés. Une exposition avant l'âge de 6 ans peut provoquer des retards physiques et intellectuels irréversibles tels que des troubles du langage, des ralentissements de la croissance, des difficultés motrices ou encore une baisse de l'acuité auditive. Chez l'adulte, une intoxication chronique au plomb augmente les risques de maladies rénales, d'hypertension et diminue la fertilité en altérant la qualité du sperme chez l'homme [32].

I.1.2. Le Cuivre, description de l'oligo-élément et toxicité

Le cuivre est un métal dur de couleur brun-rougeâtre de numéro atomique 29 et de masse atomique 63,546 u. Il possède 2 isotopes stables : ^{63}Cu et ^{65}Cu . Ces deux isotopes constituent l'ensemble du cuivre naturellement présent dans la croûte terrestre. Le cuivre est l'un des

premiers métaux découverts par l'homme, il y a 10 000 ans. Ce dernier était utilisé pour la fabrication de bijoux, d'outils, de récipients ou encore de lampes [33]. De nos jours, ce métal est utilisé pour produire des câbles électriques, des tuyaux de plomberie, mais il est aussi utilisé par l'industrie pharmaceutique comme antiseptique et antifongique [34]. L'ion cuivre est un oligo-élément nécessaire au développement de l'organisme et un apport minimal de 900 µg/jour est recommandé par l'agence des substances toxiques et le registre des maladies des Etats-Unis (ATSDR) [35]. On peut le retrouver naturellement dans les sols, les sédiments, l'eau, les plantes et les animaux [35,36]. Cependant, les activités anthropiques, telles que l'agriculture (pour ses propriétés herbicides et fongicides [35]), l'urbanisation et les exploitations minières, peuvent augmenter significativement la quantité ingérée.

Si un excès de cuivre peut s'avérer néfaste pour la santé, notamment pour les organes comme le cerveau, le foie et les reins [35], un déficit peut l'être également. Ainsi, deux maladies illustrent ces limites : la maladie de Menkès et la maladie de Wilson. La maladie de Menkès survient lorsque l'organisme présente un déficit en cuivre et peut notamment entraîner des troubles neurologiques [35]. La maladie de Wilson, due à un apport trop important de cuivre, provoque des troubles hépatiques, rénaux ainsi que des troubles neurologiques [37].

1.1.3. Réglementation et normes

De par leur toxicité pour l'homme, des limites réglementaires ont été fixées pour chacun des éléments considérés précédemment, notamment dans les eaux destinées à la consommation humaine [38]. De plus, afin d'indiquer une potentielle exposition à risque pour la santé, des seuils de normalité ont été définis, tels qu'indiqués dans le Tableau 1 [4,5]. Puisque le cuivre est considéré comme un oligo-élément, aucune valeur limite dans une matrice biologique n'a été fixée à ce jour. Néanmoins, dans le cadre d'un diagnostic de Maladie de Wilson, il est admis que la cuprémie totale sérique est comprise entre 890 et 1 335 µg/L pour un individu sain [39]. Ces réglementations fixent les concentrations de ces différents métaux à des valeurs très faibles, nécessitant alors de se tourner vers des techniques de quantification très sensibles, permettant d'atteindre des limites de quantification basses.

Tableau 1. limites réglementaires et seuils de normalité pour le cadmium, le plomb et le cuivre [4,5,38]

	Cadmium	Plomb	Cuivre
Eaux destinées à la consommation humaine – Réglementation française	5 µg/L	10 µg/L	2 mg/L
Valeurs limites biologiques – Sang	4 µg/L	300 µg/L chez la femme 400 µg/L chez l'homme	890 < X < 1335 µg/L

I.2. État de l'art des méthodes analytiques de quantification des ions métalliques

De nombreuses techniques ont été développées ces dernières années afin d'améliorer la quantification des ions inorganiques. L'une de ces techniques repose sur la séparation des ions inorganiques par chromatographie d'échange d'ions couplée à différents modes de détection, dont l'un des plus répandus est la conductimétrie. Celle-ci est souvent couplée à un suppresseur chimique d'ions afin d'abaisser les limites de quantification. Cependant, bien que relativement simple à mettre en œuvre, cette technique possède de nombreux inconvénients tels que l'impact des effets de matrice sur l'analyse, mais aussi de hautes limites de quantification, limitant de ce fait l'analyse des ions à l'état de trace [40]. D'autres méthodes telles que l'électrophorèse capillaire couplée à de multiples modes de détection comme la spectrophotométrie d'absorbance ultra-violet (UV), la conductimétrie, l'ICP-MS [41] ou encore l'électrochimie [42] ont été développées. Cependant, les techniques les plus couramment utilisées actuellement pour la quantification des ions métalliques sont les techniques spectroscopiques et spectrométriques.

1.2.1. Méthodes spectroscopiques

De nombreuses méthodes d'analyse basées sur la spectroscopie atomique permettent la quantification d'ions métalliques dans des échantillons à la fois solides mais aussi liquides. La première technique qui a été développée est la spectroscopie d'absorption atomique, en 1955 [43]. Elle repose sur le principe d'absorption de la lumière par les atomes contenus dans l'échantillon. L'échantillon est pour cela exposé à une source de lumière, de longueur d'onde spécifique correspondant à l'énergie nécessaire pour exciter les électrons de l'élément à analyser. La quantité d'énergie lumineuse absorbée est proportionnelle au nombre d'atomes dans le trajet optique [44]. D'autres techniques dérivées de l'absorption atomique ont alors été développées telles que la spectroscopie d'absorption atomique de flamme (FAAS), qui utilise une flamme pour l'atomisation de l'échantillon, ou encore la spectroscopie d'absorption atomique en four graphite (GFAAS) qui permet d'atomiser l'échantillon par chauffage électrothermique. Cependant, ces techniques présentent de nombreux désavantages tels que des limites de détection élevées, notamment pour la FAAS, des temps d'analyse longs pour la GFAAS ou encore de très importants effets de matrice.

Afin de limiter ces problématiques, la spectroscopie d'émission atomique à plasma induit (ICP-AES) a été développée. L'échantillon passe au travers d'un plasma, permettant l'ionisation/l'excitation des atomes présents dans ce dernier. L'atome, une fois excité, émet de la lumière selon un schéma spécifique de longueurs d'onde, appelé spectre d'émission, permettant alors la quantification d'un grand nombre d'éléments. Bien que plus sensible et plus rapide que certaines des spectroscopies précédentes, l'ICP-AES ne permet pas d'atteindre des limites inférieures au $\mu\text{g/L}$, limitant alors l'analyse de certains éléments à l'état de trace [45]. Cela ne permet pas non plus de réaliser une mesure isotopique des éléments limitant de ce fait son utilisation dans certains domaines tels que la radiochimie.

1.2.2. Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif

Apparue en 1983, la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) s'est imposée comme la technique de choix de la mesure élémentaire de traces voire d'ultra-traces. Pour cela, un échantillon est introduit dans la chambre de nébulisation via une pompe péristaltique pour y être nébulisé. Par la suite, l'échantillon est atomisé et ionisé dans le plasma, formé par de l'argon. Un jeu de cônes et de lentilles permet ensuite la focalisation du faisceau d'ions entrant dans le spectromètre de masse, qui permet la séparation des éléments en fonction du rapport masse/charge. Par la suite, un électro-multiplicateur permet de compter le nombre d'ions et d'amplifier le signal. Une représentation schématique de l'ICP-MS est proposée en Figure 1. Le couplage de la technique d'ionisation par plasma et de la spectrométrie de masse permet alors la mesure isotopique de chacun des éléments. Cette technique s'est rapidement imposée comme l'une des méthodes de quantification élémentaire de choix, car cette dernière permet d'atteindre des limites de quantification proche du ng/L pour certains éléments.

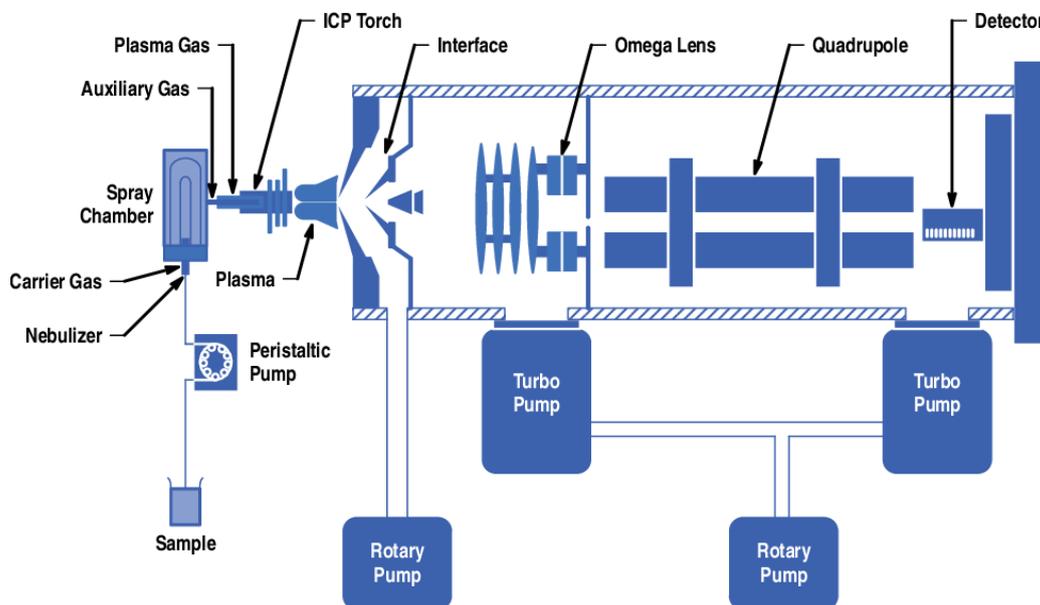


Figure 1. Représentation schématique d'un ICP-MS [46]

De plus, l'ICP-MS peut facilement être couplé à la chromatographie en phase liquide ainsi qu'à l'électrophorèse capillaire afin de réaliser des études de spéciation. En effet, la partie chromatographique ou électrophorétique permet de séparer les différentes formes d'oxydation ou formes complexées des ions métalliques, l'ICP-MS apportant une quantification ultrasensible [47]. Ce couplage est particulièrement intéressant pour des éléments dont deux espèces chimiques ont des propriétés très différentes telles que le chrome. En effet, Cr(III) peut actuellement être considéré comme un élément permettant le fonctionnement normal du métabolisme du glucose chez les mammifères. Cependant, Cr(IV) est reconnu comme toxique, provoquant lors de son ingestion des pneumonies et à son contact des dermatoses [48]. Il est donc particulièrement important de pouvoir réaliser une étude de spéciation sur cet élément notamment.

1.2.3. Comparaison et limitations des techniques actuelles de quantification

Une comparaison détaillée des méthodes spectroscopiques et spectrométriques est présentée dans le Tableau 2. Comme évoqué précédemment, on constate ici que l'ICP-MS est l'instrument permettant d'atteindre les limites de détection les plus basses. En termes de cadence analytique, paramètre particulièrement important lors d'analyses de routine, l'ICP-MS est ici encore une fois le plus performant, talonné par l'ICP-AES. De plus, cet instrument permet de travailler sur une grande gamme dynamique linéaire permettant alors de mesurer dans une même séquence des échantillons peu ou très concentrés en analyte cible.

Cependant, l'ICP-MS possède aussi certains inconvénients non négligeables, tels que le niveau de compétence requis ou encore le coût de fonctionnement de l'instrument. Le coût est lié à l'utilisation de grandes quantités d'argon, mais aussi aux consommables de hautes puretés pour limiter les contaminations. Ces coûts d'utilisation peuvent chuter drastiquement lors de l'utilisation de la FAAS par exemple.

Bien que très sensible, l'ICP-MS est sujet à de nombreux effets de matrice, notamment liés à sa faible tolérance en sels dissouts. Pour limiter ces effets de matrice, une technique de purification en amont est nécessaire. Il existe actuellement de nombreuses techniques de

purification de l'échantillon. Cependant, la technique conventionnelle pour l'extraction d'ions métalliques est la SPE.

Tableau 2. Comparaison des techniques spectroscopiques, issue de [49,50]

	FAAS	GFAAS	ICP-AES	ICP-MS
Limites de détection (µg/L)	1 - 1000	0,01 - 0,1	0,03 - 5	10^{-5} - 10^{-2}
Cadence analytique	15 s par élément	4 min par élément	2 – 12 s par élément	2 s – 5 min par élément
Gamme dynamique	10^3	10^2	10^6	10^8
Précision à long terme	10 %	1-10 %	1 - 4 %	2 - 4 %
Interférences spectrales	Très peu	Très peu	Beaucoup	Peu
Interférences liées à la matrice	Beaucoup	Beaucoup	Peu	Beaucoup
Solides dissouts en solution	0,5 - 5 %	30 %	30 %	0,1 - 0,4 %
Analyse isotopique	Non	Non	Non	Oui
Niveau de compétence requis	Bas	Moyen	Haut	Haut
Coût de fonctionnement	Faible	Moyen	Elevé	Très élevé

I.3. Etat de l'art de l'extraction sur phase solide appliquée aux ions métalliques

I.3.1. L'extraction sur phase solide

La SPE est une technique de traitement de l'échantillon basée sur des principes similaires à ceux de la chromatographie en phase liquide. Elle est basée sur le transfert de composés entre

une phase liquide, ici l'échantillon, et une phase solide, l'adsorbant. Grâce à la faible consommation de solvant qu'elle nécessite ainsi qu'un temps réduit de mise en œuvre, cette technique a petit à petit remplacé la méthode d'extraction liquide-liquide pour s'imposer comme la technique conventionnelle de purification d'échantillons liquides ou d'extraits d'échantillons solides.

1.3.1.1. Principe

Le format le plus couramment utilisé consiste à placer l'adsorbant entre deux frittés dans une cartouche. Les solutions sont alors percolées par gravité, par pression positive à l'entrée de la cartouche ou encore en plaçant une pompe à vide à la sortie de la cartouche, entraînant alors l'échantillon au travers de l'adsorbant. La SPE est composée de 5 étapes principales dont 4 sont représentées sur la Figure 2. La première étape de l'extraction est le conditionnement de l'adsorbant, consistant à solvater ses sites actifs afin de les activer et ainsi les préparer à recevoir l'échantillon. La solution de conditionnement doit être proche en termes de pH et de polarité de l'échantillon et de faible force éluante afin d'éviter une élution prématurée de l'analyte cible. Par la suite, l'échantillon contenant l'analyte cible est percolé sur l'adsorbant. Cependant, certains éléments interférents présentant une affinité pour l'adsorbant peuvent être retenus à l'issue de cette étape, d'où la nécessité de réaliser ensuite une étape de lavage qui doit permettre l'élimination des ions interférents faiblement retenus sans éluer pour autant l'analyte cible. Pour cela, une ou plusieurs solutions de composition ou de pH différents peuvent être utilisées afin d'éliminer de manière efficace les éléments interférents. Une fois le lavage réalisé, une étape d'élution de l'analyte cible est réalisée en utilisant une solution de grande force éluante. Cette fraction purifiée contenant l'analyte cible peut ensuite être quantifiée par ICP-MS par exemple. Enfin, si le support solide est réutilisable, la cartouche peut être soit reconditionnée avec une solution similaire à la solution de conditionnement, soit séchée sous flux d'azote par exemple.

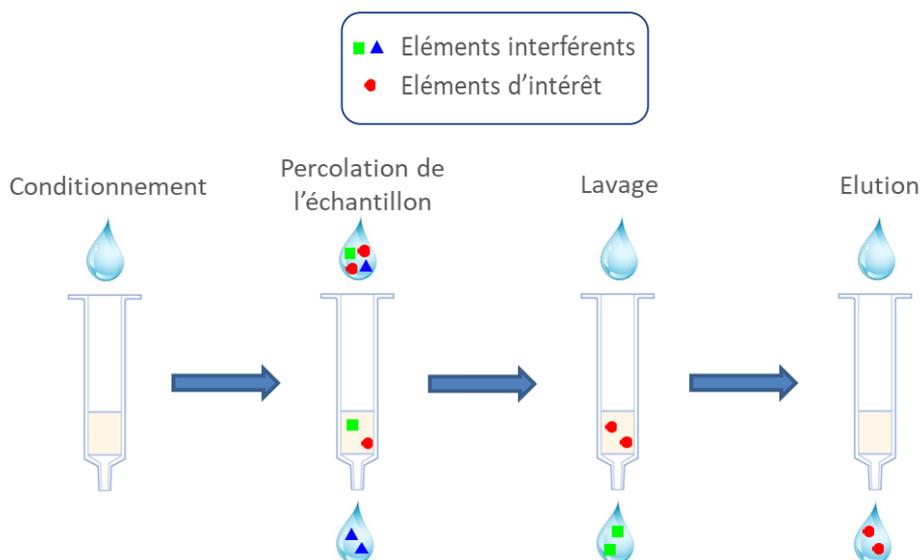


Figure 2. Principales étapes de l'extraction sur phase solide

1.3.1.2. Paramètres clés de l'extraction sur phase solide

Plusieurs paramètres peuvent avoir un impact sur les rendements d'extraction obtenus (rapport entre la quantité d'analyte extraite et celle percolée), notamment le volume de fin de fixation de l'analyte ainsi que la capacité du support.

1.3.1.2.1. Volume de fin de fixation

L'un des paramètres clé affectant les rendements obtenus en SPE est le volume de fin de fixation (*breakthrough volume*) qui s'apparente au volume d'élution mesuré en chromatographie d'élution. Lorsque l'on percole un échantillon, si le support a été convenablement choisi, l'analyte doit être retenu sur celui-ci mais il est soumis à l'effet de la composition de l'échantillon qui, de par sa force éluante même faible, conduit à la migration de l'analyte sur le support, cette migration dépendant de la force éluante de l'échantillon percolé ainsi que de l'affinité de l'analyte pour le support. Une fois l'analyte arrivé à l'extrémité du support solide, il n'est plus retenu et commence donc à être élué du support, ce début d'élution correspondant au début du pic observé en chromatographie d'élution (cf. Figure 3). Le volume nécessaire pour éluer un analyte par la simple percolation de l'échantillon

est alors appelé volume de fin de fixation, ou encore V_f , et il est propre à chaque analyte pour un adsorbant donné.

Dans le but d'obtenir des rendements d'extraction élevés, le volume d'échantillon percolé ne doit pas dépasser le volume de fin de fixation. Ce dernier peut être modifié pour un même analyte et une même nature de support en augmentant la quantité de phase (allongeant de ce fait la quantité de support à traverser par l'analyte), ou encore en modifiant la force éluante de l'échantillon. Il est possible de déterminer expérimentalement ce volume. Une première approche consiste à calculer les rendements d'extraction après percolation sur le support de volumes croissants d'échantillon (la concentration en analytes doit être adaptée d'une extraction à l'autre pour percoler la même quantité d'analytes sur le support). Dès qu'une diminution du rendement d'extraction dans la fraction d'élution est constatée, le V_f est dépassé. Une autre approche consiste à introduire l'adsorbant dans une pré-colonne couplée à un détecteur permettant de suivre l'analyte cible. L'échantillon, comme de l'eau pure si on souhaite évaluer la rétention d'un analyte en milieu aqueux, contenant l'analyte S à une concentration C_0 est ensuite percolé en continu dans la pré-colonne. Tant que l'analyte est retenu sur l'adsorbant, aucun signal ne sera mesuré par le détecteur (zone A sur la Figure 3). Lorsque le V_f est atteint, la concentration en soluté mesurée par le détecteur commence à augmenter marquant le début de l'élution du composé S du support (zone B). La concentration dans l'effluent concordant à ce volume correspond alors à 1 % de la concentration initiale C_0 . Le signal augmente ensuite jusqu'à atteindre un palier correspondant à A_0 , soit ici l'absorbance dans la solution C_0 . Le volume maximal (V_m) est alors atteint lorsque la concentration dans l'effluent correspond à 99 % de la concentration C_0 . Afin d'obtenir des rendements d'extraction de 100 %, il est alors nécessaire de percoler un volume d'échantillon inférieur au V_f , ce dernier étant dépendant de la quantité de phase et de l'affinité respective qu'a l'analyte vis-à-vis de l'adsorbant et de l'échantillon.

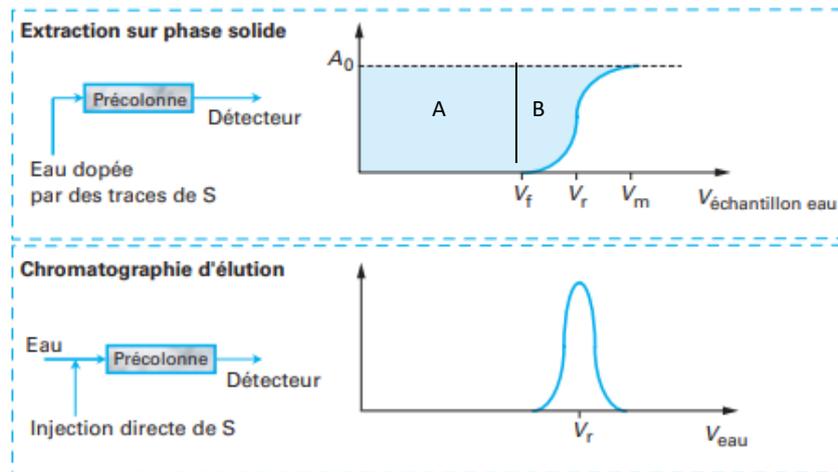


Figure 3. Analogie entre l'extraction sur phase solide et la chromatographie d'élution [51]

1.3.1.2.2. Capacité

Le deuxième paramètre clé de la SPE est la capacité du support. Elle est directement liée aux nombres de sites actifs présents à sa surface et permettant la rétention de l'analyte. On définit cette capacité comme une quantité d'analyte pouvant être retenue sur le support par quantité de support solide. Tant que cette dernière n'est pas dépassée, les analytes cible peuvent être retenus sur le support d'extraction. Cependant si l'on percole sur le support un échantillon contenant plus d'analyte que ce que peut retenir le support, on dépasse sa capacité, ce qui entraîne une élution anticipée de l'analyte cible conduisant à des rendements d'extraction inférieurs à 100% même pour des volumes percolés inférieurs à V_f .

Cette capacité peut dans un premier temps être déterminée de manière théorique, notamment lorsque l'on connaît la quantité de sites pouvant potentiellement retenir la cible, mais doit être vérifiée expérimentalement. En effet, même si l'on peut théoriquement connaître la quantité d'analyte pouvant être retenue, cette dernière peut être modifiée si l'ensemble des sites à la surface du support ne sont pas accessibles. Pour un support donné, il est alors possible de tracer une courbe de capacité telle que présentée en Figure 4. Cette courbe est composée de deux parties. Dans la première partie (A), la quantité retenue augmente proportionnellement à la quantité introduite sur le support, qui correspond donc à un rendement d'extraction constant. La courbe présente également un plateau (B) indiquant alors la saturation des sites actifs du support. La capacité se situe donc au point d'inflexion de

la courbe. Cette courbe permet alors de connaître la gamme de concentrations pour laquelle les rendements d'extraction sont constants pour un volume percolé donné.

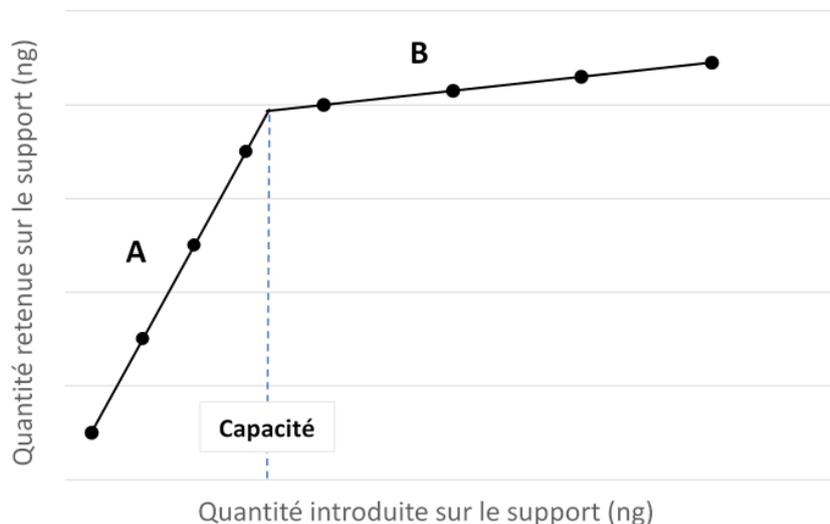


Figure 4. Exemple de courbe de capacité attendue lors de l'extraction en SPE d'un analyte

1.3.2. Supports conventionnels pour l'extraction d'ions et leurs limites

La nature du support joue un rôle primordial sur les performances constatées lors de la SPE. Des supports dit « conventionnels » sont actuellement développés et certains commercialisés, tels que les résines chélatantes, organiques ou inorganiques, ou encore les bio-supports.

1.3.2.1. Supports organiques

Une résine d'échange d'ions est une résine sur laquelle sont greffés des groupements fonctionnels anioniques (pour l'échange de cations) ou cationiques (pour l'échange d'anions) permettant la rétention des ions par interactions électrostatiques. Une grande partie des supports synthétisés pour l'extraction des cations sont composés de polymères contenant des groupements qui peuvent être de type acides forts ou acides faibles [52]. Le choix de la résine à utiliser dépend notamment de la gamme de pH pour laquelle la méthode est à développer. Certaines fonctions chimiques de type acide fort pourront être utilisées sur une large gamme

de pH car les groupements seront toujours ionisés. D'autres fonctions de type acide faible ne pourront être utilisées que sur une gamme de pH plus restreinte, car le groupement ne sera plus ionisé à de faibles pH, et ne pourra donc plus remplir sa fonction d'échangeur d'ions [53].

Les résines chélatantes, quant à elles, se basent sur la formation de complexes entre les ligands de la résine possédant des atomes donneurs d'électrons tels que N, S, O ou P et les ions. L'interaction entre les ions et la résine produit une structure stable de chélate cyclique [54]. De manière générale, deux méthodes sont utilisées pour synthétiser une résine chélatante. La première est basée sur la polymérisation de monomères de faible poids moléculaire contenant des groupements de coordination. La deuxième consiste à fonctionnaliser la surface du polymère préalablement réticulé avec le groupement de coordination.

Dans tous les cas, la rétention de l'ion métallique dépend de plusieurs facteurs : la nature, la taille et la charge de l'ion et la nature et la quantité de groupements fonctionnels présents sur la résine [55]. Des exemples de groupements utilisés pour développer des résines chélatantes sont donnés dans le Tableau 3. Il est constaté que les capacités annoncées par les auteurs sont supérieures au mg/g de résine. Les supports organiques les plus utilisés actuellement pour l'extraction d'ions métalliques sont les supports polymériques commercialisés sous le nom d'Amberlite XAD. Ces supports offrent de nombreuses modifications, telles que l'ajout de groupements chimiques, le changement de taille de pores ou de surfaces spécifiques [56]. Cependant, ces supports de grande capacité manquent de spécificité vis-à-vis d'un ion cible. Ils sont donc plutôt utilisés dans le cadre d'extraction multi-élémentaire.

Tableau 3. Exemples de résines chélatantes et groupements fonctionnels associés.
 ND: non disponible

Résines chélatantes	Groupe­ment fonctionnel	Eléments ciblés	Capacités (mg/g)	Référence
Amberlite IRC-718	-NH(CH ₂ COOH) ₂	Cu, Ni	Cu : 59 Ni : 55	[57]
CPAAm-EDA-MeTU	Méthyl Thiol-urée	Cd, Zn	Cd : 359 Zn : 39	[58]
CPAAm-EDA-PhTU	Phényl Thiol-urée	Cd, Zn	Cd : 67 Zn : 39	[58]
SP70-α-benzoine	α benzoine Oxime	Pb, Cd, Co, Cr	ND	[59]
Amberlite XAD-2000	Diéthyl­dithio-carbamate	Mn, Fe, Co, Cu, Cd, Zn, Pb, Ni	Cd : 4 Pb : 6 Cu : 6 Mn, Fe, Co, Zn et Ni : 3-6	[60]
Chelex 100	iminodiacétate	V, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd, Pb, U	Cd : 35 Pb : 64 Cu : 20 V, mn, Co, Ni, Zn, Mo et U : 6-37	[61]
Waste amidoxime	Amino et oxiamido	Pb, Cu, Cd, Zn	Pb : 115 Cu : 93 Zn : 24 Cd : 21	[62]

1.3.2.2. Supports inorganiques

Il existe aussi des supports préparés à partir de matériaux inorganiques tels que la silice, l'alumine ou encore la zéolite, qui peuvent aussi être modifiés par des groupements fonctionnels tels que ceux évoqués précédemment. Des exemples de supports inorganiques, utilisés notamment pour Cd, Pb et Cu, sont indiqués dans le Tableau 4 adapté d'une revue [52]. On constate que ces résines ne sont pas spécifiques à un seul ion d'intérêt, mais plutôt à une famille d'ions. Cela nécessite alors d'utiliser des techniques de quantification spécifiques.

Tableau 4. Exemple de supports inorganiques modifiés par des agents de complexation.
Adapté de [52]

Support inorganique	Agent de complexation	Eléments ciblés	Capacité (mg/g)	Références
Bentonite	Oxyde de trioctyle phosphine	Cd, Mn, Sb, Ni, Fe	ND	[63]
Gel de silice	N-(3-propyl)-O-phénylènediamine	Cd, Zn, Fe, Cu, Pb, Mn, Cr, Co, Ni	Cd : 19-25 Cu : 11-14 Pb : 36-46	[64]
Zeolite natrolite	5-Br-PADAP	Cu, Zn	Cu : 1 Zn : 1	[65]
Bentonite	Trioctylamine	Cr, Cu, Mg, Ni, Zn	Cu : 2 Autres ions : 2-6	[66]

1.3.2.3. Bio-supports

Outre les supports d'échange d'ions ou chélatants, des méthodes d'extraction basées sur des matériaux biologiques tels que des bactéries, algues, champignons et levures ont été développées, mettant en œuvre un mécanisme de rétention dit par biosorption. En effet, grâce à la présence de groupements fonctionnels tels que carboxylate, hydroxyle, imidazole ou encore sulfate situés à la surface de ces micro-organismes, ces derniers peuvent retenir certains ions métalliques. Il existe autant de processus de rétention que de types de groupements fonctionnels, notamment par échange d'ions ou encore par chélation [67,68]. Différents exemples de micro-organismes utilisés pour extraire des ions métalliques sont cités dans le Tableau 5. Tout comme pour les supports précédemment décrits, les bio-supports sont très majoritairement utilisés pour de l'extraction multi-élémentaire, de par leur manque de spécificité.

Tableau 5. Exemples de supports à base de micro-organismes, adapté de [67,68]

Bio-support	Elements ciblés	Capacité (mg/g)	Références
Levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cd, Cr, Cu, Pb, Zn	ND	[69]
Levure <i>Yamadazyma spartinae</i>	Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn	ND	[70]
Bactérie <i>Escherichia Coli</i>	Fe, Co, Mn, Cr	Mn : 1 Co : 2 ND pour les autres ions	[71]
Bactérie <i>Bacillus thurigensis israelensis</i>	Cd, Pb, Mg, Cr, Ni, Co	Cd : 9 Pb : 8 Autres ions : 6 - 11	[72]
Champignon <i>Aspergillus fumigatus</i>	Cu, Pb, Zn, Fe, Ni, Co	Cu : 6 Pb : 7 Autres ions : 4 - 9	[73]

1.3.2.4. Limites des supports conventionnels

L'ensemble des supports conventionnels développés sont reconnus pour leur grande capacité d'adsorption. Cependant, lors de la recherche de traces d'ions inorganiques, la capacité ne semble pas représenter l'un des critères premiers de sélection d'un support. En revanche, on constate que pour l'ensemble de ces supports, aucun n'est suffisamment spécifique pour extraire qu'un seul ion d'intérêt impliquant forcément l'utilisation d'instrument spécifiques plus ou moins coûteux. De plus, comme déjà évoqué, les techniques de quantification telles que l'ICP-MS permettant d'atteindre de basses limites de détection sont particulièrement sensibles aux effets de matrices, et donc à la présence d'autres ions métalliques co-élués avec l'ion cible. Enfin, l'utilisation de supports hautement spécifiques pourrait permet à terme de s'affranchir d'instruments coûteux pour les remplacer par des systèmes moins coûteux mais aussi moins spécifiques tels que la colorimétrie. C'est pour ces raisons que de nouveaux supports hautement spécifiques ont été ou sont actuellement en cours de développement.

1.3.3. Supports spécifiques

Des supports à base de nanotubes de carbone sont actuellement en cours de développement pour extraire des ions métalliques [74,75]. Ils peuvent être décrits comme des structures cylindriques composées de feuilles de graphène enroulées, appelées « feuille de graphène ». Ces derniers peuvent être classés en deux catégories : les nanotubes à paroi simple (SWCNT) ou à parois multiples (MWCNT) [76]. Ces derniers sont représentés en Figure 5. Le diamètre des tubes est de l'ordre du nanomètre, ce qui leur confère une grande surface spécifique, permettant une meilleure adsorption des analytes. De plus, ces nanotubes peuvent être fonctionnalisés par des groupements chimiques permettant d'augmenter la spécificité du support pour l'analyte cible [9]. Cependant, comme pour les résines chélatantes, les nanotubes retiennent souvent les ions de manière peu spécifique, puisque qu'un certain nombre d'ions métalliques possèdent des comportements similaires face à des groupements chimiques. En effet, dans l'une des publications citées dans le Tableau 6, la rétention d'autres ions a été testée sur le support développé et bien que Cu(II) ait été l'ion le mieux retenu et que la présence des autres ions n'empêchait pas sa rétention, l'ensemble des ions métalliques testés ont aussi été retenus sur le support [77]. Cela démontre donc le manque de spécificité de ces supports développés.

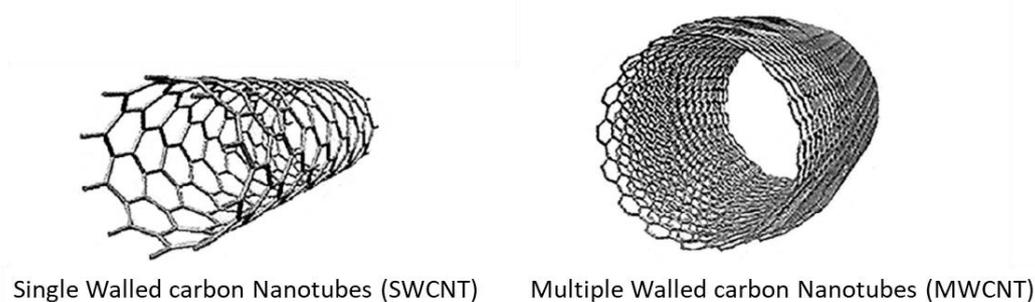


Figure 5. Structure des nanotubes de carbone [76]

D'autres supports, appelés Metal Organic Frameworks (MOF), ou encore Polymères de Coordination Poreux (PCP), sont actuellement en cours de développement [7,78,79]. Cette famille regroupe les composés hybrides poreux issus d'assemblage d'entités organiques et inorganiques. La structure cristalline est formée par complexation de cations métalliques et de ligands. Les MOF peuvent être classés soit par la nature chimique des éléments qui le

composent, soit par le type de porosité qui en résulte [80]. Les MOF sont essentiellement utilisés pour éliminer certains ions d'échantillons. Le mécanisme de rétention est lié à trois phénomènes distincts : la physisorption, la chimisorption et l'échange d'ions. Les métaux peuvent être piégés dans les pores des MOF et retenus par des interactions électrostatiques ou encore des liaisons de type Van der Waals [81]. De plus, des phénomènes similaires à ceux retrouvés avec les supports conventionnels chélatants ou d'échange d'ions avec les groupements présents à la surface du MOF peuvent avoir lieu. L'ensemble des mécanismes intervenant dans la rétention des ions métalliques sont présentés en Figure 6.

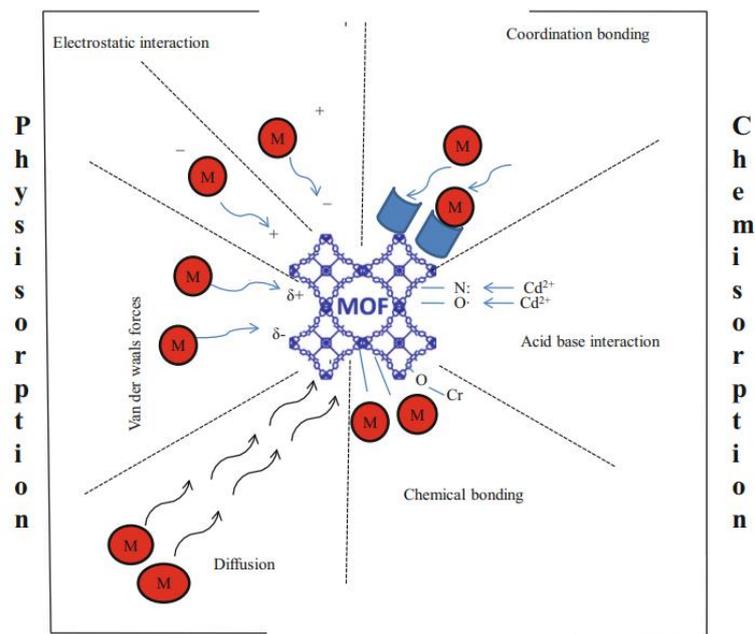


Figure 6. Mécanisme de rétention des ions métalliques sur les MOF [81]

La structure cristalline des MOF leur confère une grande capacité d'adsorption [81]. Cependant, à l'instar des résines conventionnelles, ils sont peu spécifiques à un ion métallique donné. Néanmoins, ces supports semblent plus prometteurs en termes de spécificité, notamment grâce aux mécanismes de rétention dans les pores, la taille de ces derniers pouvant donc jouer le rôle de filtre vis-à-vis d'autres ions métalliques. Cependant, l'objectif étant dans la plupart des études la dépollution des eaux d'un métal, les auteurs étudient en

détail le mécanisme de rétention de l'ion cible mais ne testent que très rarement la spécificité du support vis-à-vis d'autres ions métalliques comme illustré dans le Tableau 6.

De manière analogue aux polymères à empreintes moléculaires (MIP) développés pour l'extraction sélective de molécules, l'un des supports hautement spécifiques pour l'extraction des ions métalliques est le polymère à empreintes ioniques (IIP) [82]. Ce type de polymères possède des cavités hautement spécifiques à l'ion pour lequel il a été développé [8,83,84]. La synthèse d'un IIP se déroule généralement en trois étapes, comme illustré en Figure 7. Dans la première étape, l'ion cible ou un ion analogue, appelé ion empreinte, est complexé dans un solvant ou un mélange hydro-organique avec un ou plusieurs monomères fonctionnels choisis pour leur capacité à se complexer avec l'ion empreinte. Ensuite, la polymérisation est effectuée autour des complexes ion-monomères en ajoutant un agent réticulant et un initiateur. Après polymérisation, les ions empreintes sont éliminés du polymère, généralement à l'aide d'une solution acide pour les cations ou d'un agent complexant. Cela permet la libération des cavités, à savoir des sites complémentaires en termes de taille, de forme et de fonctions de l'ion solvaté. Ces cavités permettent ensuite une reconnaissance spécifique de l'ion cible, qui peut être évaluée en comparant la rétention de l'ion cible à celle d'autres ions.

Une grande partie des applications avec les IIP a été réalisée en SPE en mode dispersif (dSPE). Cette technique est basée sur la mise en contact de particules d'IIP avec l'échantillon directement dans un bécher ou un tube et non dans une cartouche d'extraction. Bien que le risque d'obturation des frittés présents dans une cartouche de SPE est éliminé en mode dispersif, la dSPE présente des inconvénients tels que des procédés longs ou encore une séparation des particules et de l'éluat complexe [85].

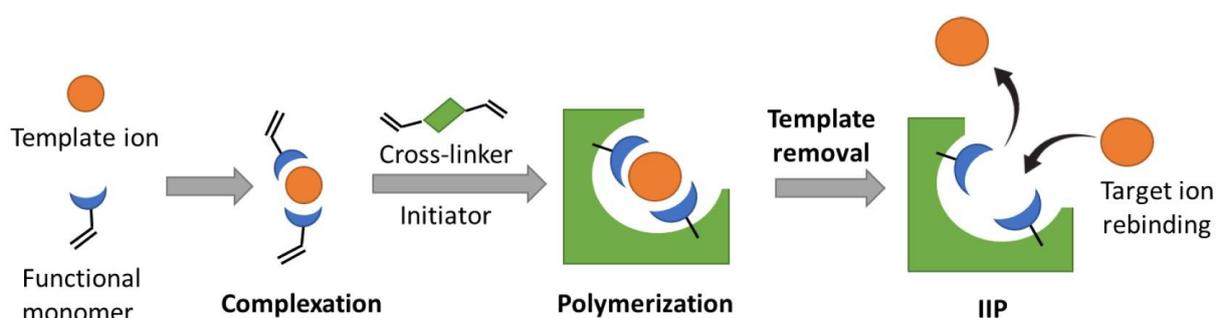


Figure 7. Synthèse d'un IIP [86]

En ce qui concerne la spécificité des IIP, elle a été étudiée et confirmée par de nombreux auteurs comme le montre le Tableau 6. De plus, au sein du laboratoire, de nombreuses études ont été réalisées pour développer des IIP hautement spécifiques et sélectifs pour des cibles telles que le radium [87], le cuivre [88] ou les lanthanides [89,90]. A chaque fois, une optimisation approfondie des conditions de synthèse ainsi que des conditions d'extraction a été réalisée afin d'obtenir une rétention spécifique et sélective de l'ion ciblé sur l'IIP et non sur le support contrôle (polymère non imprimé ou NIP) comme illustré Figure 8 dans le cas de Cu(II). La capacité du support a été déterminée à 63 µg/g. Enfin, des applications avec des échantillons d'eau minérale ainsi qu'une eau de mer ont été réalisées afin de démontrer la suppression des effets de matrice en ICP-MS.

Cependant, on peut souligner que les IIP présentent comme désavantages qu'ils requièrent l'utilisation de monomères ou solvants toxiques, et des optimisations, qui peuvent être longues et complexes, de leur voie de synthèse et de la procédure d'extraction.

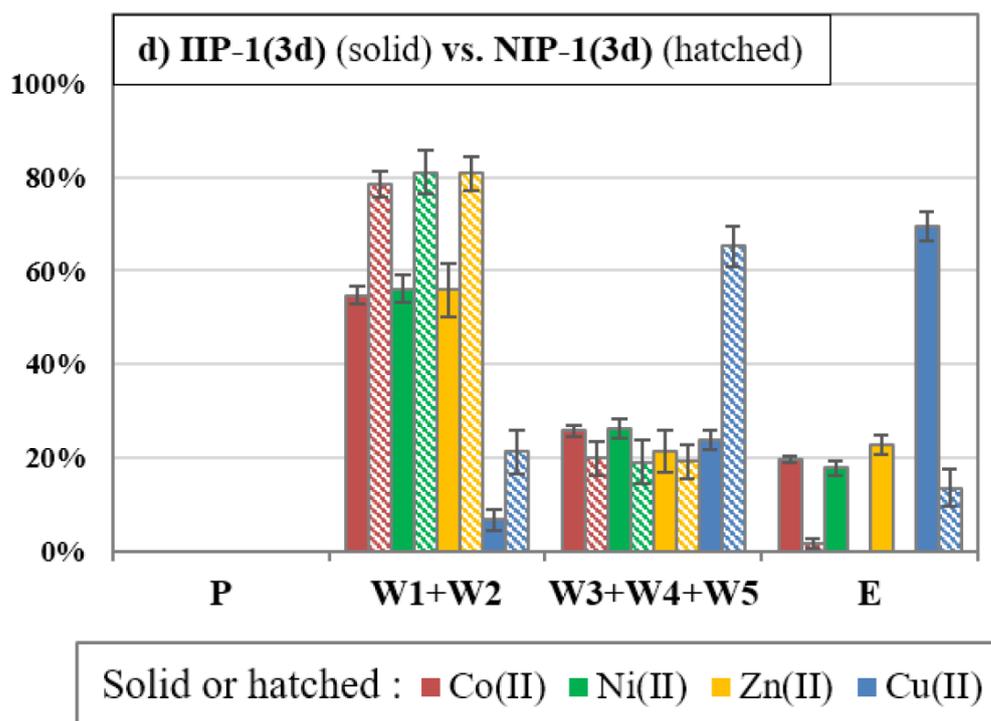


Figure 8. Profils d'extraction du Co(II), Ni(II), Zn (II) et Cu(II) sur l'IIP-1(3d) ciblant Cu(II) ainsi que sur son support contrôle NIP-1(3d). Percolation (P) : 1 mL de HNO₃ pH 5,5 dopé à 30 µg/L avec Co(II), Ni(II), Zn(II) et Cu(II) ; lavages successifs (W) avec 1 mL de HNO₃ pH 4 ; Elution (E) : 2 mL de HNO₃ 5 % [88]

Tableau 6. Exemple d'utilisation des supports hautement spécifiques, adapté de [7–9]. Les éléments interférents retenus sur le support sont indiqués en gras. NI : non indiqué, ND : non déterminé

Nature du support	Mode d'extraction	Elements cible	Elements interférents testés	Rendements de l'élément cible (%)	Capacité (mg/g)	Limites de quantification (µg/L)	Echantillon réel	Référence
MWCNT	SPE	Cd	ND	NI	ND	0,035	Sérum humain	[91]
MWCNT	SPE	Cu	Co, Ni, Zn, Pb, Mn, Cd	91-96	4,1	7	Eau d'étang	[77]
MWCNT	SPE	Pb	ND	≈ 95	ND	8,6	Eaux potables, eau de mer synthétique, ail	[92]
MOF	dSPE	Cd	ND	≈ 100	181,8	0,13	Eaux de rivière, eaux potables, eaux de rejet industriel	[93]
MOF	dSPE	Cu	ND	95	2,4	NI	Eaux potables, eaux de lac	[94]
MOF	dSPE	Pb	ND	≈ 100	198	0,97	Riz, foie de porc, feuilles de thé, eaux potables	[95]
IIP	dSPE	Cd	Ca, Mg, Zn, Pb, Cu, Co, Fe	94 - 106	267	0,1	Eau minérale, eau de lac, urine, cigarette	[96]
IIP	SPE	Cu	Cd, Co, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn	96	4,9	NI	Otolithe de poissons, cendre d'os, eau de mer	[97]
IIP	dSPE	Pb	Co, Cr, Zn, Ni	81	38,5	NI	Eau de rejet industriel	[98]
IIP	SPE	Ra	Sr, Ba, La, Co, Ag, Tl, Pb, Bi, Li, Rb, Cs, V, Nb, Mo, W, As, Sb	100	0,417	NI	Eaux potables	[87]
IIP	SPE	Cu	Co, Ni, Zn	75 - 96	63	0,05	Eaux minérales, eaux de mer	[88]

I.4. Conclusion

La quantification d'ions métalliques à l'état de trace dans des échantillons complexes peut être réalisée par de nombreuses techniques qui sont cependant, soit peu spécifiques, soit fortement impactées par les effets de matrices. Il semble alors nécessaire d'ajouter une étape de traitement de l'échantillon en amont de l'analyse afin de pallier les limites actuelles des instruments. La SPE est la technique la plus couramment utilisée pour le traitement de l'échantillon. Cependant, les supports conventionnels tels que les résines d'échange d'ions apparaissent comme peu efficaces en termes d'extraction spécifique pour un ion métallique donné. C'est pour cette raison que de nouveaux supports plus spécifiques ont été ou sont actuellement en cours de développement, tels que les MOF, les nanotubes de carbone ou encore les IIP. Les IIP peuvent notamment permettre d'extraire spécifiquement un ion cible. Cependant, ils nécessitent une phase de développement parfois longue et complexe, avec l'utilisation de solvants et de monomères toxiques. Parmi les nouveaux supports hautement spécifiques en cours de développement, l'un a particulièrement retenu notre attention : les supports fonctionnalisés par des aptamères appelés oligoadsorbants (OS). Les aptamères sont de simples brins d'ADN ou d'ARN sélectionnés pour leur forte affinité et spécificité vis-à-vis d'un analyte cible donné. Leur potentiel dans le cadre de l'extraction de molécules a largement été démontré [99–101]. Nous nous sommes donc intéressées à leur utilisation pour la reconnaissance et l'extraction d'ions métalliques modèles, tels que Cd(II), Pb(II) et Cu(II).

Chapitre II

Les aptamères, état de l'art et applications à l'analyse d'ions métalliques

Chapitre II - Les aptamères, état de l'art et applications à l'analyse d'ions métalliques

II.1. Généralités sur les aptamères et leurs applications pour les molécules

Les aptamères sont des simples brins d'ADN ou d'ARN constitués de quelques dizaines à une centaine de bases. Ces derniers ont la capacité d'adopter une structure tridimensionnelle leur permettant de retenir spécifiquement la cible pour laquelle ils ont été sélectionnés. Le mot aptamère est dérivé du latin « aptus » (attaché à) et du grec « meros » (partie). Les premiers aptamères ont été isolés en 1990 en associant une synthèse aléatoire d'oligonucléotides, une sélection et une amplification des séquences. L'ensemble du processus appelé SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) sera expliqué plus en détail dans la suite de ce chapitre. Une fois identifié et synthétisé, l'aptamère peut être utilisé afin de développer des capteurs, des systèmes d'extraction ou encore pour de l'imagerie pour de nombreux domaines d'études, tels que la surveillance environnementale, la toxicologie ou encore la dermatologie.

II.1.1 Structure des aptamères

Afin de mieux appréhender les phénomènes de rétention d'un analyte par un aptamère, il apparaît tout d'abord nécessaire de décrire la structure primaire, secondaire et tertiaire d'un aptamère.

II.1.1.1. Structure primaire

La structure primaire d'un aptamère est composée d'un enchaînement de nucléotides. Chaque nucléotide est composé de trois parties : une base azotée (ou nucléobase), un sucre comme le pentose (2'-désoxyribose) pour l'ADN, ainsi qu'un groupement phosphate. Les 4

bases azotées constituant l'ADN sont la thymine (T), l'adénine (A), la guanine (G) et la cytosine (C). Les bases azotées sont réparties en deux groupes, les bases puriques (A et G) et les bases pyrimidiques (C et T). L'ARN quant à lui possède la même structure que l'ADN, à l'exception de la nature du sucre (le désoxyribose est remplacé par un ribose) ainsi que de la nature de l'une des bases pyrimidiques (la thymine est alors remplacée par l'uracile (U)). La structure des bases azotées de l'ADN et l'ARN est présentée en Figure 9. Les groupements phosphate présents sur chacun des nucléotides portent deux charges négatives.

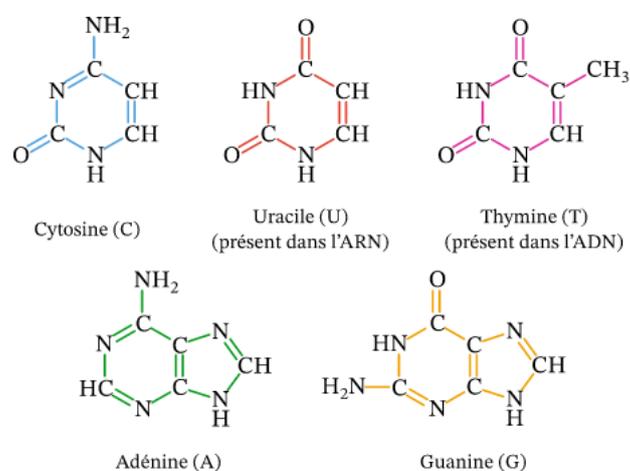


Figure 9. Structure des bases azotées constituant l'ADN et l'ARN [102]

La séquence d'acides nucléiques se forme par réaction de condensation, entre le sucre pentose d'une base nucléique et le groupement phosphate de la base voisine [103]. Cette réaction est représentée en Figure 10. Le nombre de charges négatives de la séquence correspond donc au nombre de nucléotides dont elle est composée, car une charge négative sur chacun des groupements phosphate est conservée lors de la formation de la liaison phosphodiester. L'ensemble forme donc un polymère, dont la lecture est réalisée de manière conventionnelle dans le sens 5' vers 3', en référence aux numéros des atomes de carbone composant les sucres pentose.

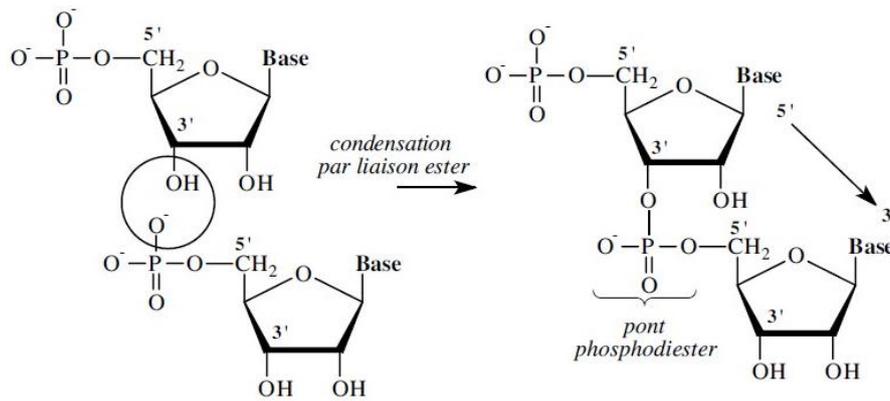


Figure 10. Formation d'une liaison phosphodiester entre deux nucléotides [104]

II.1.1.2. Structure tridimensionnelle

Selon le modèle de Watson-Crick, les bases azotées peuvent s'associer deux à deux par liaisons hydrogène pour former des paires de bases dites canoniques, la guanine s'associant avec la cytosine par trois liaisons hydrogène et l'adénine avec la thymine (ou l'uracile dans le cas de l'ARN) par deux liaisons hydrogène (Figure 11). Cette capacité, couplée à la flexibilité du squelette sucre-phosphate, permet alors à la séquence nucléotidique de s'associer avec une autre séquence ou encore de se replier sur elle-même. La stabilité de la structure est ainsi assurée par les liaisons hydrogène formées, mais aussi par l'empilement des cycles contenus au sein des bases azotées formant la séquence.

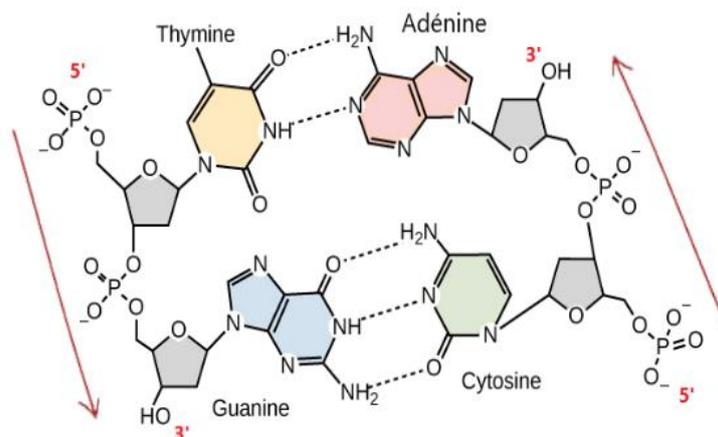


Figure 11. Appariement des paires de bases nucléotidiques par liaisons hydrogène [105]

Le type de motifs, et donc de structures secondaires, formés par les interactions entre les bases est varié. La structure secondaire la plus connue est la double hélice, formée entre deux séquences nucléotidiques complémentaires (Figure 12.A). Un brin d'ADN peut aussi se replier sur lui-même, lui permettant alors d'adopter de nombreuses conformations représentées en Figure 12. Les structures (B), (C) et (D) sont composés de deux parties : une ou plusieurs tiges constituées de l'ensemble des paires de bases qui se sont appariées, et la boucle, constituée de bases nucléotidiques n'ayant pas pu former d'interactions avec une autre base.

La structure (E) est quant à elle constituée de guanines qui ont la capacité, lorsqu'elles sont sur le même plan, de former des interactions par liaisons hydrogène. L'association d'au moins deux motifs composés de 4 guanines, appelées tétrade, entraîne alors la formation du motif non-canonique, particulièrement stable, nommé G-quadruplex.

La stabilité des structures formées par ces interactions entre les bases varie en fonction du nombre de liaisons hydrogène, du nombre d'empilements π - π formés par les cycles aromatiques des bases [106] et de la solvation des phosphate permettant de limiter la répulsion électrostatique [107].

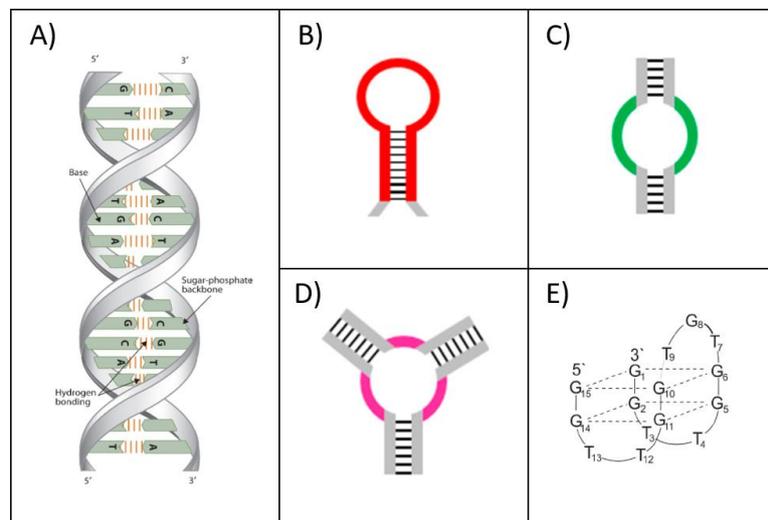


Figure 12. Représentations schématiques des principales structures secondaires. (A) : double hélice [108] ; (B) : tige-boucle [109] ; (C) : boucle interne [109] ; (D) : boucles multiples [109] ; (E) : G-quadruplex [110]

La structure tertiaire de l'ADN se réfère à la manière dont le ou les brins d'ADN sont organisés et pliés dans l'espace tridimensionnel afin de former une structure compacte. Cela est en fait directement lié à la nature des groupements constituant le/les brins ainsi qu'aux interactions entre ces derniers. La structure tertiaire est donc formée par l'interaction des motifs issus de la structure secondaire, telle que montré en Figure 13. D'autres éléments extérieurs à la séquence tels que la présence de cations mono ou divalents (Mg^{2+} ou NH_4^+ par exemple) ou de méthanol peuvent permettre la stabilisation de la structure tertiaire formée [111].

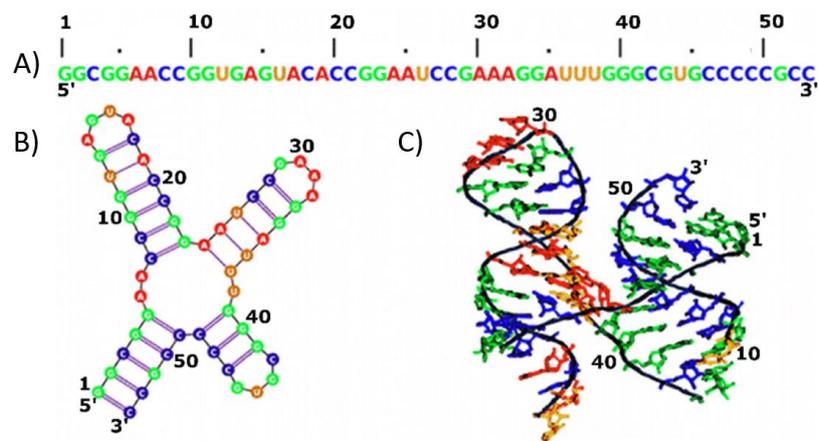


Figure 13. Exemple d'ARN représentée en structure primaire (A), secondaire (B) ou tertiaire (C) [112]

II.1.2. Fixation d'un aptamère à sa cible

Jusqu'ici, il a été démontré que les brins d'ADN et d'ARN, composés de bases nucléotidiques, ont la capacité de changer de conformation. Cela est notamment dû à la grande flexibilité du squelette sucre-phosphate ainsi qu'aux nombreux groupements constituant les séquences qui peuvent réaliser des interactions entre eux ou avec d'autres molécules / ions. Cela forme donc des motifs structuraux secondaires qui ensuite se replient et se condensent pour former la structure tridimensionnelle du brin. L'ensemble des motifs formés lors de l'appariement des paires de bases (structure secondaire) de l'ADN intervient dans le mécanisme de fixation d'un aptamère à sa cible. Différentes études portant sur la compréhension des mécanismes de

fixation aptamères-cibles ont été réalisées permettant alors de conclure quant à la diversité des interactions existantes.

Une étude portant sur la caractérisation d'un aptamère ayant pour cible le facteur de croissance endothélial vasculaire humain (VEGF) a démontré le rôle clé du motif tige-boucle sur le mécanisme de reconnaissance [113]. En effet, l'aptamère décrit comme spécifique à la cible a été comparé à des aptamères modifiés / tronqués. Lorsqu'une modification est réalisée sur la boucle du motif, l'affinité de l'aptamère pour la cible ne change pas. Lorsqu'une modification est réalisée dans la tige du motif, une perte d'affinité de l'aptamère pour la cible est constatée. De plus, l'appariement des groupements terminaux de l'aptamère semble jouer un rôle clé dans la stabilisation de la structure de l'aptamère et donc de sa capacité à se lier à sa cible.

Deux aptamères permettant la fixation de la trombine ont aussi été étudiés afin de comprendre les mécanismes de rétention [114]. Le premier, de 15-mer (15 bases), a été identifié comme formant un motif G-quadruplex, alors que le second aptamère, de 29-mer, forme un motif type « hairpin » (ou épingle à cheveux). Une étude du mode de rétention sur chacun des motifs a permis de démontrer que la structure G-quadruplex permettait la rétention de la trombine par interactions électrostatiques alors que le motif hairpin fixait la trombine par des effets hydrophobes. Ces aptamères permettent donc tous deux de fixer la cible, mais pas avec les mêmes types d'interactions. Afin de faciliter la mise en place de telles interactions, un ajustement de la composition du milieu peut s'avérer nécessaire, en remplaçant notamment le potassium par du magnésium pour la formation de la structure hairpin pour l'aptamère 29-mer.

La caractérisation d'un aptamère spécifique à la L-tyrosine a permis de démontrer la multiplicité des interactions mises en jeu dans le mécanisme de liaison aptamère-cible [115]. En effet, il a été conclu, d'après les expériences menées en dichroïsme circulaire, que le groupement phényle de la L-tyrosine contribue à l'effet hydrophobe dans l'empilement des bases, alors que le groupement NH_3^+ permet de former des interactions électrostatiques. L'ensemble des interactions établies permettent à l'aptamère de changer de conformation pour une structure plus stable, la stabilité de la structure étant favorisée par l'ajout de Mg^{2+} dans le milieu.

Les interactions entre un aptamère et sa cible semblent donc régies par de nombreuses interactions intermoléculaires telles que les liaisons hydrogène, le π - π stacking, les effets hydrophobes ou encore les interactions électrostatiques. Il est à noter que la composition du milieu, notamment la présence de cations, joue un rôle clé dans la fixation aptamère-cible. Il a en effet été constaté que des ions tels que Mg^{2+} ou Sr^{2+} établissent des interactions électrostatiques avec les groupements phosphate, minimisant alors la répulsion entre ces derniers. Cela permet alors d'augmenter la flexibilité du squelette sucre-phosphate, facilitant alors le changement de conformation de l'aptamère en présence de sa cible [115–117].

II.1.3. Processus d'identification d'aptamères spécifiques : le procédé SELEX

II.1.3.1 Principe général

Le procédé SELEX permet la sélection d'un ou plusieurs aptamères reconnaissant une cible donnée. Le processus fut décrit pour la première fois en 1990 par les deux équipes indépendantes de Szostak [118] et Gold [119]. Ils ont tous deux utilisé une banque aléatoire d'oligonucléotides, afin de sélectionner une séquence présentant de l'affinité pour une cible particulière, qui a subi par la suite une répétition de cycles d'amplification, ces étapes constituant alors les bases du processus SELEX, représenté en Figure 14.

La première étape du processus est la génération d'une banque d'oligonucléotides d'environ 10^{13} à 10^{15} séquences [120]. L'ensemble des séquences ainsi générée est exposé à la cible (cellules, protéines, peptides...). Les oligonucléotides liés à la cible sont alors séparés de ceux non liés puis soumis à une réaction par polymérisation en chaîne (PCR) ou une polymérisation en chaîne reverse transcriptase (RT-PCR) afin d'augmenter leur quantité et les soumettre à nouveau à un cycle de sélection (de 7 à 15 cycles), permettant l'obtention des séquences de plus forte affinité pour la cible. Une fois les différents cycles effectués, les oligonucléotides retenus sont alors séquencés afin d'en connaître leur composition.

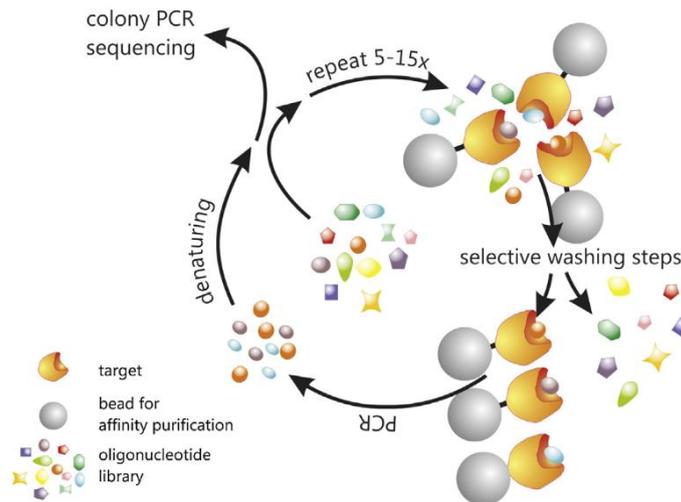


Figure 14. Représentation schématique du processus SELEX [121]

II.1.3.2. Choix de la bibliothèque d'oligonucléotides

La banque d'oligonucléotides est composée de séquences d'ADN ou d'ARN synthétisées chimiquement. Chacune des séquences est composée d'une partie aléatoire (généralement la partie centrale de la séquence) ainsi que d'une ou plusieurs extrémités fixes aux régions 5' et/ou 3', servant d'amorces pour l'amplification par PCR ou RT-PCR. La portion aléatoire détermine la diversité de la banque de séquences d'oligonucléotides. En effet, il est théoriquement possible d'obtenir, pour une région variable de n nucléotides, 4^n séquences aléatoires, puisque chacune des positions peut être occupée par les bases guanine, cytosine, thymine ou adénine dans le cas de l'ADN par exemple. En pratique, le premier cycle de sélection ne peut difficilement contenir plus de 10^{15} séquences différentes, correspondant alors à des séquences de 25 nucléotides dans la partie variable [122]. Un processus SELEX réalisé avec un nombre de bases contenues dans la séquence variable supérieur à 25 nucléotides ne permettra pas à la cible d'être mise en contact avec l'ensemble des séquences de la bibliothèque [123]. Ce nombre de nucléotides est, pour la majeure partie des petites molécules ciblées, suffisant pour identifier un aptamère avec une forte affinité pour sa cible. Cependant, dans le cadre de l'utilisation du processus SELEX ciblant des molécules plus complexes (protéines, cellules ...), la diversité structurale imposée par de plus grandes séquences peut représenter un avantage. En effet, des motifs de liaisons particulièrement

complexes peuvent nécessiter une longueur minimale de bases pour être formés, nécessitant alors de travailler avec une séquence de bases aléatoires supérieure à 25 nucléotides. De plus, un grand nombre de bases dans la partie aléatoire peut permettre de former plusieurs sites de reconnaissance à la cible. La longueur de la région variable de la séquence doit donc permettre à la fois d'obtenir une grande diversité de séquences mises en contact avec la cible (mise en contact favorisée par des séquences contenant moins de 25 bases) mais aussi l'obtention d'une grande diversité structurale des séquences (favorisée par des séquences contenant plus de 25 bases). La longueur des séquences aléatoires est généralement comprise entre 40 et 70 bases dans la plupart des études reportées [124].

II.1.3.3. Sélection des séquences à forte affinité pour la cible

Une fois la banque d'oligonucléotides choisie, cette dernière est mise en contact avec la cible. Afin de séparer par la suite les séquences liées à celles non liées à la cible, il est nécessaire d'immobiliser la cible ou les séquences sur un support. La technique conventionnelle repose sur l'immobilisation de la cible sur des billes, ayant, par exemple, des propriétés magnétiques [125]. La cible peut aussi être greffée sur un support utilisé comme phase stationnaire de chromatographie d'affinité [126]. La sélection peut être optimisée en jouant sur la concentration de la cible, la nature du tampon lors de la fixation et le volume de lavage qui précède l'élution [122]. Cette technique basée sur l'immobilisation de la cible présente une limite. En effet, la fonction de la molécule utilisée pour l'immobilisation sur le support ne peut pas interagir avec les séquences, ce qui peut affecter le procédé de sélection en éliminant certaines séquences qui présenteraient de l'affinité pour cette partie de la molécule. De plus, cela peut modifier la répartition des charges et des électrons sur la molécule, une fois celle-ci immobilisée.

Pour éviter cet effet, d'autres méthodes ne nécessitant pas l'immobilisation de la cible ont été développées. La mise en œuvre du processus SELEX en électrophorèse capillaire permet notamment de s'affranchir du support et de limiter le nombre de cycles de sélection à réaliser (4 cycles en moyenne pour cette technique) [127]. La séparation du complexe aptamère-cible des séquences non liées est réalisée grâce à leur différence de mobilité électrophorétique, comme par exemple dans le cadre de la sélection de séquences d'aptamère spécifiques à la

lactoferrine bovine [127]. Une autre limite de la technique SELEX est le temps nécessaire et la quantité de réactifs à utiliser. Ainsi, il peut être envisagé de miniaturiser les supports permettant de réaliser les étapes de sélection et de séparation des séquences liées à la cible de celles non liées en recourant à des puces microfluidiques, dans lesquelles les protéines cibles sont intégrées à des gouttelettes de gel synthétisées par voie sol-gel. Les protéines cibles sont pour cela mélangées à différents réactifs permettant la formation du gel. Le mélange est ensuite appliqué sous forme de gouttelettes, ces dernières étant complètement gélifiées au bout de 12 h. Après un traitement au plasma à oxygène, les gouttelettes sont mises en contact avec une banque d'aptamère, les protéines vont alors retenir les séquences pour lesquelles elles ont de l'affinité. Cette méthode permet, en un seul cycle de SELEX, la sélection de séquences spécifiques à de multiples protéines [128]. Néanmoins, la structure tridimensionnelle de la protéine à l'état natif peut avoir été perdue lors de la formation du gel.

Afin d'améliorer la spécificité de la séquence sélectionnée, un cycle de sélection négatif (ou rétro-sélection) peut être réalisé en amont de la sélection avec la cible (appelée sélection positive). Pour cela des composés interférents, souvent des analogues structuraux du composé cible que l'on ne souhaite pas retenir, sont incubés avec les séquences présélectionnées. Les séquences liées à ces composés sont ensuite éliminées, éliminant de ce fait les possibles interactions des séquences conservées avec ces composés. Cette étape de sélection négative peut aussi être réalisée en aval de la sélection positive [129].

II.1.3.4. Amplification des séquences

Une fois les séquences ayant une affinité pour la cible séparées des séquences non-affines, une étape d'amplification des séquences est réalisée. Lorsque la bibliothèque d'oligonucléotides est constituée de séquences d'ADN, l'amplification est généralement réalisée par PCR. Pour cela, les séquences sont dénaturées (augmentation de la température aux alentours de 95°C) puis incubées avec les amorces de la PCR afin d'identifier le point de départ de la réaction. Ces amorces reconnaissent la partie constante de la séquence et viennent interagir avec cette dernière. Une fois les amorces fixées, les séquences sont mises en contact avec la Taq polymérase à une température de 72°C (température optimale pour

l'action de la polymérase) conduisant à la synthèse d'un brin complémentaire au premier brin. Ces étapes de dénaturation, d'hybridation des amorces, d'élongation et de synthèse du brin complémentaire sont ensuite répétées, généralement une vingtaine de fois.

Si la bibliothèque d'oligonucléotides est constituée de séquences d'ARN, l'amplification par PCR n'est pas possible. Il est donc nécessaire de réaliser dans ce cas une amplification par transcription inverse (RT-PCR). Premièrement, l'ARN est inversé et transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par la transcriptase inverse. Deuxièmement, l'ADNc est ensuite amplifié par PCR comme expliqué précédemment.

Après plusieurs cycles de PCR ou RT-PCR réalisés, le produit qui en résulte se compose principalement d'ADN doubles brins. Afin de passer au cycle de sélection suivant, il est nécessaire que les simples brins d'ADN sélectionnés précédemment soient séparés du brin complémentaire formé lors du processus de polymérisation. Parmi les protocoles existants, l'un consiste à réaliser une séparation après dénaturation des doubles brins. Une modification du protocole classique de PCR est réalisée puisqu'une amorce spécifique au simple brin à conserver est modifiée avec une biotine. Cette amorce est ensuite utilisée dans le processus de PCR. Une fois l'ensemble des cycles de PCR réalisé, la solution est mise en contact avec de la streptavidine. Un complexe simple brin d'ADN-biotine-streptavidine est ensuite formé avec les simples brins à conserver. Un champ électrique est ensuite appliqué au mélange simple brins biotinylés / non biotinylés permettant la séparation de ces derniers par différence de mobilité électrophorétique [130]. D'autres techniques, telles que la digestion enzymatique, après utilisation d'une amorce 5'-phosphate sur le brin complémentaire, peuvent être réalisées. Cependant, cette technique peut s'avérer coûteuse à mettre en place par l'utilisation d'enzymes. De plus, la réaction enzymatique peut être incomplète, ce qui entraîne la présence de sous-produits non désirés [131].

La technique de PCR dite « asymétrique » est de nos jours couramment utilisée afin de générer, à l'issue des cycles d'amplification, la séquence précédemment sélectionnée en grande quantité. Un schéma est proposé en Figure 15. Pour cela, une quantité limitée de l'une des deux amorces utilisées (P2 sur le schéma ci-dessous) dans le processus PCR symétrique est incubée avec les séquences pour amplification. Une fois l'amorce placée en quantité limitée consommée pour l'amplification produisant des doubles brins, le mécanisme de PCR utilise la seule amorce restante (P1 sur le schéma ci-dessous) pour produire des répliques du

seul brin d'ADN désiré. Une purification par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) est ensuite réalisée. Cette technique limite donc la formation de brins complémentaires non sélectifs en faveur du brin sélectif [132].

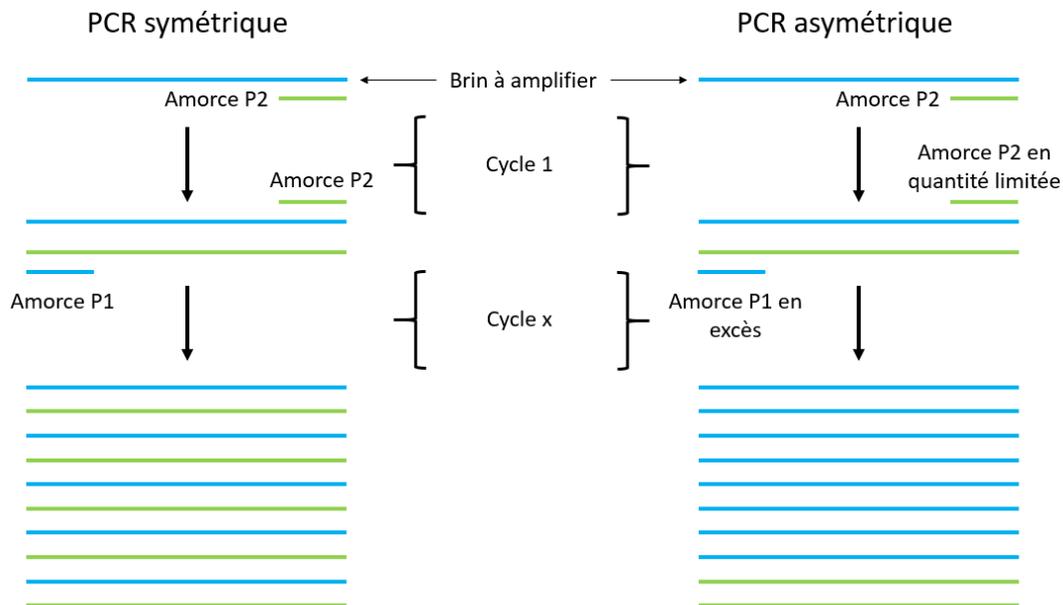


Figure 15. Processus de PCR symétrique et asymétrique pour une amplification d'ADN simple brin

Cependant, quelle que soit la technique mise en œuvre, il existe des inconvénients à prendre en compte lors du choix de la technique. L'une des limites est la production de séquences non spécifiques (appelées sous-produits) lors du processus d'amplification. Ce phénomène est d'autant plus rencontré lorsque les concentrations d'amorces sont différentes l'une de l'autre (tel que dans la PCR asymétrique). L'enzyme permettant la réplication de l'ADN (la Taq polymérase) peut aussi incorporer des erreurs lors de cette réplication, produisant alors de ce fait des sous-produits. Afin de limiter la production de ces sous-produits, plusieurs paramètres peuvent être optimisés tels que le nombre de cycles de PCR. En effet, plus le nombre de cycles est faible, plus le risque d'erreurs est limité. De plus, plus la séquence à amplifier est longue, plus le risque que cette dernière soit amplifiée avec une erreur est élevé. D'autres paramètres permettant d'améliorer la qualité de l'amplification sont à optimiser tels que la température

de réaction, la durée d'incubation pour chacune des étapes, ainsi que la composition des réactifs mis en jeu dans la réaction (concentration des réactifs, nature des amorces)[131,133].

II.1.3.5. Spécificité des protocoles SELEX ayant pour cible des ions métalliques

Lorsque la cible du processus SELEX est un ion métallique, il semble impossible de fixer ce dernier sur un support afin de réaliser la partie sélection du protocole SELEX. Il existe donc une stratégie consistant à immobiliser la banque d'oligonucléotides sur un support, modifiant de ce fait le protocole classique de sélection des séquences. Cela implique l'utilisation d'une séquence dite « d'assistance », ayant la faculté de se lier à la partie 3' constante des oligonucléotides de la banque [134]. Cette séquence est fonctionnalisée par un groupement biotine. Une fois la banque mise en contact avec cette séquence, le mélange est incubé avec de l'agarose greffée par un tétramère de streptavidine, permettant alors de former le complexe biotine-streptavidine et donc d'immobiliser l'ensemble des oligonucléotides de la banque comme illustré en Figure 16. Par la suite, les billes sont mises en contact avec l'ion cible. Les séquences ayant une forte affinité pour la cible se détachent des billes. Une simple centrifugation permet alors de séparer les séquences liées de celles non liées à l'ion. Une colonne peut aussi être remplie avec les billes sur lesquelles est immobilisée la banque, la solution contenant l'ion ciblé est donc percolée au travers de cette colonne [135,136]. Une fois la solution percolée sur la colonne, les séquences avec une forte affinité pour la cible sont alors éluées. Après élimination de l'ion cible, un protocole de PCR symétrique ou asymétrique est réalisé. Enfin, une étape de séparation des brins synthétisés est réalisée par SDS-PAGE. Cela permet de ne récupérer que les brins cibles pour réaliser une nouvelle étape de sélection.

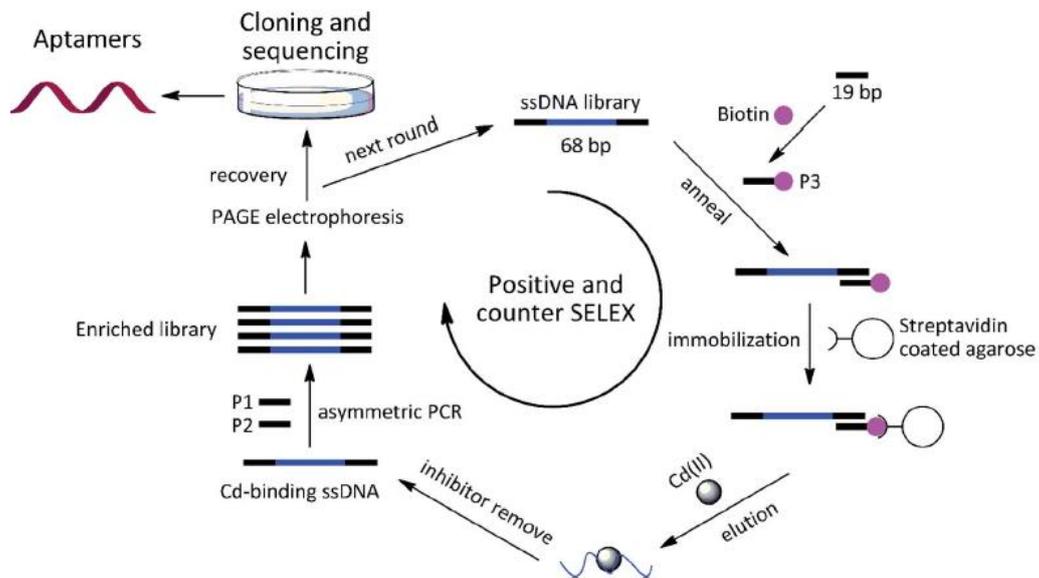


Figure 16. Sélection de séquences spécifique au Cd(II) par interaction biotine-streptavidine P3 : brin complémentaire biotinylé permettant l'immobilisation de la séquence. P1 et P2 : amorce de la réaction de PCR asymétrique. [134]

II.1.3.6. Modélisation de la structure des séquences

Une fois une ou des séquences identifiées par le processus SELEX, il est alors possible de modéliser ces séquences en 2 dimensions afin de mieux comprendre la conformation en solution. Pour cela des logiciels tels que mfold DNA ont été développés [137]. Ce logiciel repose sur le calcul de l'énergie libre ΔG afin de former la structure la plus probable pour laquelle l'énergie libre calculée est la plus faible. En plus de la nature de la structure, il est également possible d'intégrer dans le calcul la température mais aussi la concentration en Na^+ et Mg^{2+} qui peuvent influencer sur la structure adoptée par l'aptamère [138]. Cependant, ce logiciel comporte quelques inconvénients tels que l'impossibilité de prendre en compte d'autres cations que ceux cités précédemment. De plus, le logiciel est incapable de représenter des structures tri-dimensionnelles telles que la structure G-quadruplex.

II.2. Développement d'oligoadsorbants spécifiques aux molécules

Précédemment, nous nous sommes intéressés à la description d'un aptamère ainsi qu'à l'identification d'une séquence spécifique à une cible. Nous allons maintenant nous

concentrer sur le développement et l'utilisation d'aptamères pour le développement d'oligoadsorbants spécifiques aux molécules, puisque c'est ce qui a été le plus décrit jusqu'à présent dans la littérature. Une description approfondie des choix et paramètres clés de l'oligoextraction de molécules sera réalisée. Enfin, nous nous intéresserons à l'utilisation des aptamères ciblant des ions afin de mieux appréhender les travaux déjà réalisés et les enjeux du développement de supports fonctionnalisés par des aptamères pour l'extraction d'ions métalliques

II.2.1. Choix de la séquence d'aptamère

Le développement de supports d'extraction à base d'aptamères nécessite au préalable de choisir des séquences prometteuses pour l'extraction de l'analyte cible. Pour cela, deux méthodes peuvent être employées : l'une consiste à identifier une séquence par le processus SELEX, comme expliqué dans la partie précédente, l'autre consiste à utiliser une séquence identifiée et décrite par d'autres auteurs. Avant de sélectionner une séquence pour un analyte décrite dans la bibliographie, il est intéressant de considérer la valeur de la constante de dissociation. En effet, ce paramètre définit l'affinité de l'aptamère pour sa cible [139]. Dans le cadre du développement d'oligoadsorbants (OS), cette constante doit être, en effet, la plus faible possible, de l'ordre de celle des anticorps, soit < 100 nmol/L, afin d'espérer une forte rétention de l'analyte cible par l'aptamère permettant alors la percolation de volumes d'échantillon suffisants pour obtenir un effet de concentration. Le Tableau 7 issu d'une revue regroupe différents exemples d'aptamères sélectionnés pour des petites molécules mais aussi pour des peptides et des protéines [101]. On constate que sur l'ensemble des exemples cités, seule une partie des séquences présente des constantes de dissociation (K_d) inférieures à 100 nmol/L (décrites en vert dans le tableau). De ce fait, toutes les séquences déjà décrites dans la littérature ne peuvent pas être utilisées afin de développer un OS.

Tableau 7. Exemple d'aptamères identifiés pour une cible et leur constante de dissociation [101]

Cible	Type d'aptamères	K _d (nmol/L)
Petites molécules organiques (masse moléculaire inférieure à 2000 g/mol)		
L-Arginine	ARN	330
Cocaïne	ADN	5 000
Cyanocobalamine (co-facteur)	ARN	88
Dichlofénac	ADN	43
Ethanolamine	ADN	6–19
17β-Estradiol	ADN	130
Fuminosine B1	ADN	100
Kanamycine A/B	ARN	≤300/180
Lividomycine	ARN	≤300
Malachite green	ARN	118–800
Moenomycine A	ARN	300–400
Neomycine	ARN	≈100
Théophylline	ARN	100
Sulforhodamine B	ADN	190
Ochratoxine A	ADN	50
Oxytétracycline	ADN	9–56
Sialyl Lewis (carbohydrates)	ADN	0.085–10
Tétracycline	ADN	64
Tobramycine	ARN	2–3
Zéaralenone	ADN	41
Peptides et protéines		
Bovine thrombine	ARN	164–240
HIV-1 reverse transcriptase	ADN	0.18–0.5
Immunoglobuline E	ADN	10
Neurotensine récepteur 1 (rat)	ARN	0.37
Oncostatine M	ARN	7
protéine Cellulaire du prion	ARN	0.1–1.7
Ricin toxine	ADN	58–100
L-Selectine	ADN	2
Streptavidine	ARN	7
α-Thrombine	ADN	200
Thyroïde transcription facteur 1	ADN	3.3–67

II.2.2. Greffage de la séquence

Une fois la séquence pour l'analyte cible sélectionnée, cette dernière doit être greffée sur un support solide afin de synthétiser un OS. Pour cela, plusieurs choix peuvent être faits tels que la nature du support solide et la possibilité d'ajouter un brin espaceur.

II.2.2.1 Choix du support de greffage et de sa fonctionnalisation

Afin de synthétiser un OS pour l'extraction, plusieurs matériaux peuvent être utilisés. Le matériau le plus utilisé reste l'agarose (ou la Sépharose, un type d'agarose). Cependant, des auteurs utilisent aussi les monolithes comme support d'immobilisation tel qu'illustré dans le Tableau 8 [140].

Ensuite, sur un matériau donné, plusieurs types de fonctionnalisation, nécessitant de modifier de manière adéquate le brin d'aptamère sur sa partie 5' ou 3' pour permettre son immobilisation, peuvent être possible. L'un des greffages les plus rapportés est celui sur agarose activée par de la streptavidine par interaction biotine-streptavidine avec des aptamères préalablement biotinylés. Bien que facile à mettre en œuvre, l'interaction par affinité biotine-streptavidine peut s'avérer fragile puisque cette dernière peut être rompue par la température, mais aussi par l'utilisation de solvants organiques [141]. Afin de pallier ce problème, d'autres fonctionnalisations conduisant à un greffage covalent ont été utilisées telles que de la Sépharose activée CNBr (bromure de cyanogène) ou NHS (N-hydroxysuccinimide), nécessitant l'introduction d'un groupement NH_2 à l'extrémité de l'aptamère. La fonctionnalisation choisie sur le matériau d'immobilisation dicte donc la nature de la modification à réaliser sur le brin d'aptamère.

Tableau 8. Exemple de choix de supports solides et de modifications de l'aptamères afin de réaliser le greffage. Issu de [140]

Analyte cible	Echantillon	Phase solide/activation	Modification de l'aptamère
Aflatoxine B2	Cacahuète	Sépharose /CNBr	NH ₂ -C ₇
Histones	Lysat de cellules	Agarose / streptavidine	Biotine
Cocaïne	Plasma	Sépharose / CNBr	NH ₂ -C ₆
	Sang post mortem		NH ₂ -C ₁₂
Ochratoxine A	Blé	Agarose / diamino-dipropylamine	-
	Poudre de Gingembre	Sépharose / thiol	NH ₂ -C ₆
Thrombine	Sérum humain	monolithe poly(TMOS-co-γ-MAPS) / alcène	SH-C ₆
OH-déoxyguanosine	Urine	Nanoparticules magnétiques / amine + glutaraldéhyde	NH ₂
Adénosine	Cortex de rat dialysé	Billes de verre poreuses / streptavidine	Biotine-TEG
Cytochrome C	Sérum	monolithe poly(GMA-co-TRIM) / streptavidine	Biotine

CNBr : bromure de cyanogène ; TMOS : orthosilicate de tétraméthyle ; MAPS : méthacrylate triméthoxysilane ; GMA-co-TRIM : glycidyl méthacrylate -co- triméthylolpropane triméthacrylate ; TEG : triéthylène glycol

Au sein de l'équipe, une comparaison des modes de greffages pour le développement d'un support fonctionnalisé par des aptamères pour l'extraction de la cocaïne a été réalisée [10]. Quatre types de greffage ont été étudiés : le premier avec de la Sépharose activée CNBr (A), le second avec de la Sépharose activée thiol (B), le troisième avec de la silice activée glutaraldéhyde (C) et le dernier avec de l'agarose activée Streptavidine (D). Une représentation schématique de chacun des greffages est donnée en Figure 17. Pour chacun des greffages réalisés, un support contrôle sans aptamère a été synthétisé afin d'étudier l'éventuelle contribution du support dans le processus de rétention. Un OS est jugé sélectif si une différence de comportement entre le support greffé et le support non greffé est constaté lors de l'extraction de la molécule cible. Cette étude a mis en lumière la difficulté du greffage sur la silice activée glutaraldéhyde, largement utilisée par l'équipe pour l'immobilisation d'anticorps, puisqu'une absence de rétention de la molécule cible a été observée sur les

supports greffés et non greffés. Une des hypothèses expliquant cette absence de rétention est la présence d'un revêtement de polymère polyéthylèneimine hydrophile chargé positivement (à pH 6) à la surface des billes de silice et favorisant de ce fait la formation d'interactions non-spécifiques avec les résidus phosphate des aptamères gênant leur greffage. En ce qui concerne la Sépharose activée thiol, aucun aptamère n'a été greffé sur la Sépharose. Plusieurs raisons peuvent être avancées telles que l'hydrolyse du groupement ester-thiol avant le greffage ou encore une perte durant une étape de précipitation du protocole. L'immobilisation sur Sépharose activée CNBr ou streptavidine a permis en revanche un greffage efficace des aptamères. Ainsi, cette étude a montré que la méthode d'immobilisation doit donc être consciencieusement choisie afin de permettre tout d'abord le greffage des aptamères puis une rétention seulement par interactions spécifiques de la cible lors du protocole d'extraction après greffage.

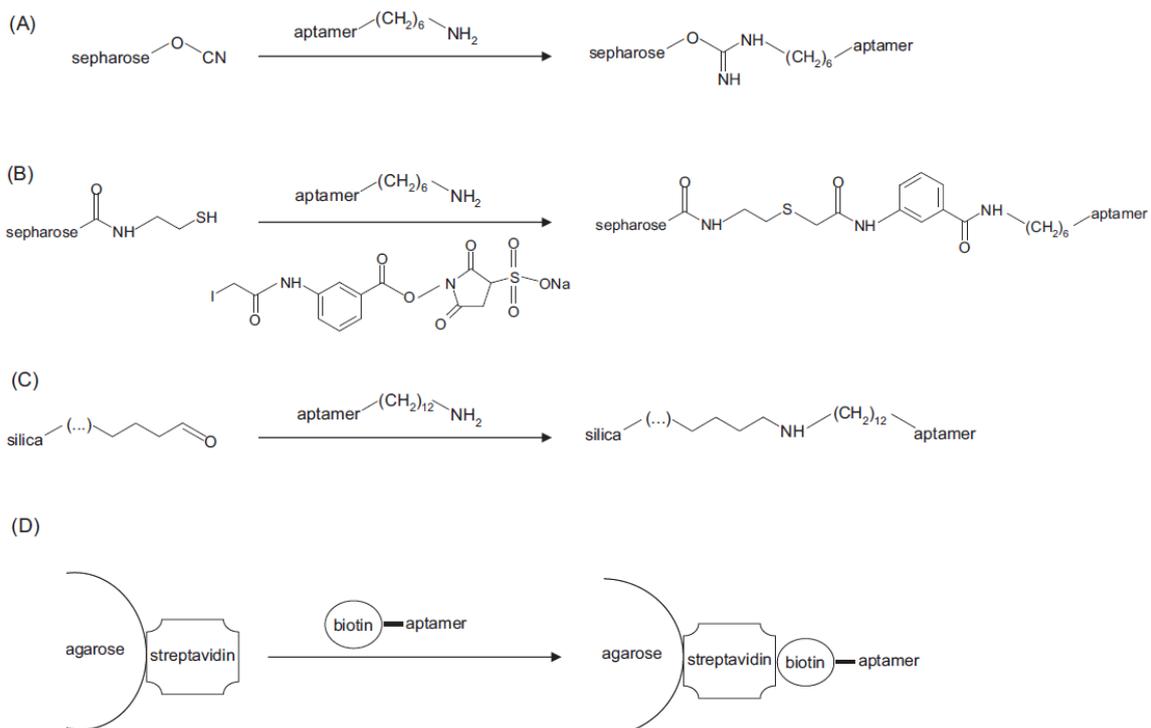


Figure 17. Immobilisation des séquences d'aptamères sur différents supports solides (A) Sépharose activée CNBr, (B) Sépharose activée thiol, (C) Silice activée glutaraldéhyde, (D) Agarose activée streptavidine [10]

II.2.2.2 Choix du bras espaceur

Comme mentionné précédemment, différentes modifications peuvent être apportées sur la séquence d'aptamère. L'une d'elles consiste en l'ajout d'un bras espaceur, très majoritairement constitué d'une chaîne carbonée C_6 à C_{12} entre l'aptamère et le groupement permettant l'immobilisation sur le support solide. Ce bras espaceur doit permettre d'éloigner l'aptamère du support d'immobilisation et donc d'éviter les gênes stériques empêchant à l'aptamère de prendre une structure tridimensionnelle nécessaire au piégeage et donc à la rétention de la cible. Comme démontré précédemment dans le Tableau 8, les auteurs utilisant la fonction NH_2 pour l'immobilisation ajoutent aussi un bras espaceur, mais ce dernier varie dans le nombre de carbones qui le constitue. Pour compléter l'étude menée sur les méthodes d'immobilisation, notre équipe a évalué l'influence de la longueur du bras espaceur sur les taux de greffage (dont le principe de mesure sera explicité ci-après) ainsi que sur les performances de l'extraction [10]. Le taux de greffage a été plus important avec l'utilisation d'un bras espaceur C_{12} (67% contre 37% pour l'espaceur C_6). Cela peut être dû à une meilleure accessibilité du groupement NH_2 intervenant dans l'immobilisation. Cependant, les capacités expérimentales mesurées sur chacun des supports étaient similaires quelle que soit la longueur du bras espaceur utilisé. L'utilisation d'un bras espaceur C_{12} conduit donc à plus de séquences greffées mais une grande partie de celles-ci sont inactives et ne participent donc pas au mécanisme de rétention de l'analyte cible. Il en a donc été conclu que les performances des supports greffés via un bras espaceur C_6 ou C_{12} étaient similaires en termes de rétention de la molécule cible, la cocaïne dans ce cas, puisque pour les deux supports les capacités expérimentales déterminées étaient équivalentes et surtout suffisantes par rapports aux concentrations recherchées.

II.2.2.3. Mesure des taux de greffage

Une fois le support d'immobilisation et la longueur du bras espaceur sélectionnés, le greffage est alors réalisé. Afin de prouver que les aptamères ont été immobilisés avec succès, certains auteurs analysent le support par spectroscopie Raman ou encore par infrarouge à transformée de Fourier, le greffage devant modifier le spectre obtenu [142]. En complément, des mesures en microscopie électronique à balayage peuvent être réalisées en comparant un

support non greffé à un support sur lequel des aptamères sont immobilisés [143]. Bien que ces techniques permettent de démontrer la présence d'aptamères sur le support solide, cela ne permet pas de quantifier la quantité d'aptamères greffés sur le support. Pour répondre à cette problématique, une méthode de mesure des taux de greffage a été développée au laboratoire [144].

Une fois le greffage réalisé et le support solide introduit dans une cartouche entre deux frittés, la solution issue du greffage ainsi que les trois premières fractions de lavage du support sont récupérées. Ces fractions sont par la suite analysées par chromatographie de paires d'ions, avec comme agent d'appariement l'acétate de triéthylammonium, couplée à une détection par spectrophotométrie d'absorbance UV. Une courbe d'étalonnage est préalablement réalisée pour chacune des séquences greffées. La stratégie consiste alors à calculer la concentration obtenue dans les fractions issues de l'immobilisation, et donc d'obtenir la quantité d'aptamères non greffés sur le support. Connaissant la quantité introduite pour réaliser le greffage, il est alors possible de calculer la quantité d'aptamères greffés, et donc de déterminer le taux de greffage de chacune des séquences. Celui-ci permet ensuite de déterminer la capacité théorique, en considérant qu'une mole d'aptamère interagit avec une mole d'analyte cible. Cette capacité théorique s'exprime alors en ng d'analyte par quantité d'OS introduit dans la cartouche. Cette valeur permet d'estimer la quantité maximale d'analyte pouvant être percolée sur le support, tant que la capacité expérimentale du support n'a pas été déterminée. Il est à noter que cette valeur est souvent surestimée en comparaison à la capacité expérimentale, du fait que l'ensemble des séquences greffées ne sont pas toutes « actives » pour la rétention de l'analyte [101].

II.2.3. Paramètres clés de l'oligoextraction de molécules

Une fois l'OS synthétisé, les premiers essais d'oligoextraction sont réalisés. Afin d'optimiser les performances de l'extraction, différents paramètres clés doivent être pris en compte tels que le choix de la séquence contrôle afin d'étudier la sélectivité mais aussi le choix des conditions de percolation, de lavage et d'élution.

II.2.3.1. Sélectivité et choix du support contrôle

Lors de l'étape de percolation de l'analyte sur l'OS, des interactions non spécifiques peuvent s'établir avec l'analyte et d'autres composés présents dans l'échantillon conduisant à leur rétention et limitant de ce fait les performances analytiques, notamment la sélectivité de la procédure. Pour évaluer la contribution de ces interactions dans le processus de rétention, un support de contrôle peut être synthétisé en parallèle. Il existe différents types de support pouvant être utilisés comme contrôle. Premièrement, un support non greffé par des aptamères peut être utilisé afin d'évaluer les interactions non spécifiques sur le support d'immobilisation [11,145–147]. Un support greffé avec une séquence n'ayant pas d'affinité pour la cible peut aussi être sélectionné comme support de contrôle. Il est alors possible d'utiliser soit une séquence aléatoire d'oligonucléotides [148,149], soit une séquence dite « Scramble » qui est constituée des mêmes bases nucléotidiques que dans la séquence spécifique, mais placées dans un ordre aléatoire [10,147,150]. Cela permet notamment d'évaluer les interactions non spécifiques potentielles sur le squelette sucre-phosphate ainsi que sur les bases nucléotidiques de la séquence. Une fois ce support de contrôle synthétisé, le protocole d'oligoextraction est alors optimisé en étudiant les profils de rétention de l'analyte sur les deux supports en parallèle de manière à sélectionner au mieux les conditions de percolation, de lavage du support et d'élution de l'analyte cible.

II.2.3.2. Optimisation de l'étape d'oligoextraction pour l'analyse de molécules organiques

La nature des interactions entre les aptamères et la cible est différente d'un aptamère à l'autre. En effet, la rétention de l'analyte cible dépend de la structure tridimensionnelle qu'adopte l'aptamère. Or, comme évoqué précédemment, la structure adoptée par une séquence d'aptamère en solution est sensible à la composition du milieu. De manière logique, le milieu favorisant le plus la rétention de l'analyte doit être proche de celui dans lequel la séquence a été sélectionnée, c'est-à-dire le tampon de sélection utilisé dans le processus SELEX [140]. Il est donc dans la plupart du temps testé comme premier milieu de percolation. De nombreux paramètres peuvent aussi influencer les performances analytiques tels que la

température [151,152], la force ionique [153] mais aussi le pH [153,154] des solutions percolées, qui peuvent modifier la conformation de l'aptamère mais aussi sa charge apparente et donc les mécanismes de rétention mis en jeu.

Un conditionnement de la cartouche avec le tampon de percolation est nécessaire afin de préparer le support à recevoir l'échantillon, en appliquant des conditions de force ionique et de pH similaires à celles de l'échantillon. Puis, pendant la percolation, l'analyte cible est retenu sur le support spécifique. Si une étude de spécificité est réalisée, des molécules interférentes sont également introduites dans le milieu percolé et elles peuvent être déjà en partie éliminées lors de cette étape. Concernant le support de contrôle, l'analyte peut être partiellement voire totalement retenu lors de la percolation de l'échantillon, ainsi que les molécules interférentes. Il est alors nécessaire d'ajouter une ou des étapes de lavage, afin d'éliminer l'analyte cible et les interférents du support contrôle retenus par des interactions non spécifiques. La solution de lavage peut être la même que celle de percolation [155], mais elle peut aussi contenir des sels ou encore de faibles proportions de solvants organiques, le but étant de supprimer les interactions non spécifiques sans affecter les interactions analyte cible-aptamère. A l'issue de ce lavage, si l'oligoextraction est sélective et spécifique, seul l'analyte cible est retenu sur le support greffé avec la séquence spécifique.

L'élution de l'analyte cible est ensuite réalisée afin de procéder à sa quantification par diverses méthodes chromatographiques et/ou spectrométriques. Pour cela, une solution de force éluante élevée pour l'analyte est utilisée, telle que des solvants organiques [142]. L'objectif est de minimiser le volume d'éluant à utiliser par rapport au volume percolé afin de concentrer l'analyte cible dans l'extrait final. Une étape d'évaporation peut aussi être réalisée, suivie d'une reprise dans un faible volume de solvant compatible avec la méthode de quantification choisie afin de concentrer encore l'analyte. A l'issue de l'ensemble de ces étapes, l'extrait final doit être purifié et ne contenir que l'analyte cible. Un profil d'oligoextraction idéal est présenté en Figure 18. Sur le support contrôle, aucun des composés percolés n'est retenu jusqu'à l'élution, démontrant l'absence d'interactions non spécifiques avec l'OS. Seul l'analyte cible est retenu sur l'OS jusqu'à l'étape d'élution, contrairement aux interférents éliminés lors des étapes de percolation et de lavage, démontrant la sélectivité (absence de rétention de l'analyte cible sur le support de control) et la spécificité (absence de rétention des autres composés sur l'OS) de la procédure d'oligoextraction.

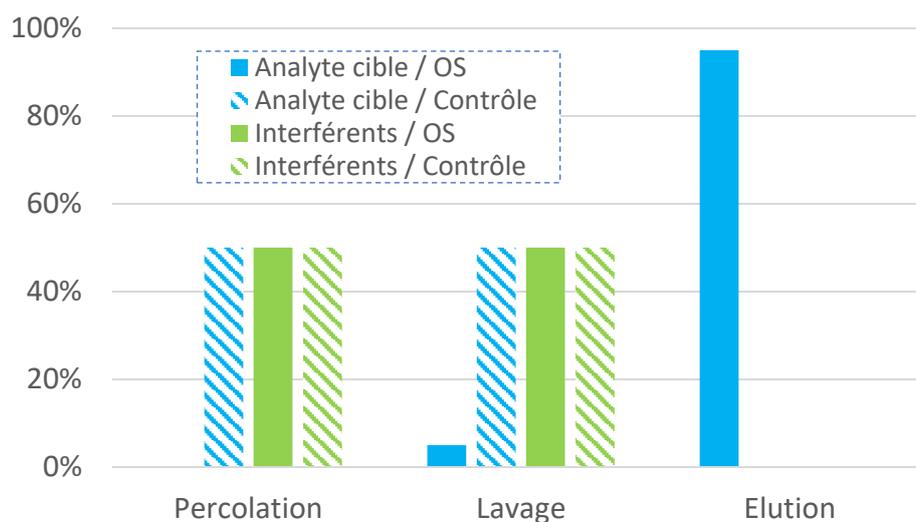


Figure 18. Profils d'extraction attendus sur le support spécifique (OS) ainsi que sur le support de contrôle

II.2.3.5. Régénération / Réutilisation

Une fois l'oligoextraction réalisée, les OS peuvent être reconditionnés afin de régénérer les aptamères. Pour cela, l'OS est placé dans un milieu tel que le tampon de sélection. Si les immunoadsorbants, basés sur l'utilisation d'anticorps greffés, nécessitent d'être régénérés dans le tampon pendant une longue durée (24 à 48 h) [140], quelques minutes suffisent pour régénérer les aptamères et donc pouvoir réutiliser l'OS [156]. De plus, il a été démontré que les OS peuvent être réutilisés de nombreuses fois. En effet, dans le cadre d'une étude portant sur l'extraction de l'ochratoxine A par des supports miniaturisés fonctionnalisés par des aptamères, aucune diminution des rendements d'extraction n'a été observée après plus de 30 extractions sur un OS, dont 7 faites avec des échantillons de bière [157].

II.2.3.6. Applications des aptamères pour cibler des molécules

Des aptamères ayant pour cible des molécules ont d'ores et déjà été utilisés dans des domaines variés afin d'extraire / purifier la cible de son environnement [99,101]. En ce qui

concerne l'oligoextraction de molécules, l'un des domaines qui a été ciblé est le suivi de toxines ou de polluants dans l'environnement et dans les matrices alimentaires. L'ochratoxine A (OTA), de par ses propriétés carcinogènes, a été particulièrement étudiée dans des matrices environnementales et alimentaires telles que de la poudre de gingembre [158], des extraits de blés [159] ou encore du vin [11]. La recherche de traces d'antibiotiques tels que l'enrofloxine ou la sulfadiméthoxine dans des matrices comme le lait ou le poisson ont aussi fait l'objet d'une extraction par les aptamères [100].

Les aptamères greffés sur des supports solides peuvent aussi être utilisés dans le cadre de la purification de macromolécules telles que la L-selectine (plusieurs dizaines de kDa) [160]. Cela a ainsi permis de remplacer la purification par immunoaffinité traditionnellement utilisée mais qui présente de nombreux inconvénients tels que les limites imposées par l'utilisation d'anticorps en termes de nature des solutions d'élution ne détériorant par ces derniers. Les aptamères peuvent aussi être appliqués à l'extraction de bactéries pathogènes telles que la *Salmonelle* [161] ou encore *Escherichia coli* [162].

De par le greffage simplifié ainsi que la facilité de modification des aptamères, ces derniers peuvent aussi être intégrés dans des systèmes miniaturisés. Par exemple, les aptamères peuvent être greffés sur des monolithes, eux-mêmes synthétisés dans des capillaires de quelques dizaines de μm de diamètre interne. Cette approche permet de réduire les coûts du matériel et des solvants d'extraction mais aussi de coupler l'étape d'extraction à une méthode de séparation et de quantification telle que la spectrométrie de masse par exemple [100]. Ainsi, un capillaire contenant un monolithe fonctionnalisé permettant la rétention de la thrombine a été couplé à un détecteur UV [163]. Enfin, une approche d'immobilisation des aptamères sur monolithes a aussi été utilisée pour extraire l'ochratoxine A d'échantillons de bière, le système d'extraction étant alors couplé en ligne à une nano chromatographie en phase liquide ainsi qu'à un détecteur de fluorescence induite par laser [164]

Enfin, les aptamères peuvent être utilisés dans le développement de capteurs. De nombreux dispositifs ont été mis en place après immobilisation des aptamères sur une surface ou un support adapté au mode de détection choisi tel que la colorimétrie, l'électrochimie ou la fluorescence [165,166]. Dans un grand nombre d'études, l'ajout d'un groupement réactif, adapté au mode de détection choisi, en 3' de l'aptamère a été réalisé. Par exemple, cela a permis la détection rapide de toxines telles que l'Aflatoxine B1 [167]. Comme elle est

carcinogène, elle est particulièrement suivie, dans les matrices alimentaires notamment. Afin de réaliser une mesure rapide de sa concentration, un capteur greffé avec une séquence identifiée comme spécifique à cette toxine a été développé. La séquence a été greffée sur une électrode d'or par ajout d'un groupement thiol en 5'. Une modification sur la séquence a été réalisée par insertion d'une molécule de bleu de méthylène au sein de l'aptamère. La fixation de la cible sur l'aptamère rapproche le groupement méthylène de l'électrode, modifiant alors le signal électrochimique mesuré comme illustré en Figure 19. Il est aussi à noter que l'utilisation d'une séquence contrôle a été réalisée afin de démontrer la sélectivité de la séquence spécifique. Une fois le développement analytique avec des échantillons synthétiques réalisé, l'Aflatoxine a été détectée dans des échantillons de vin et de lait de référence, démontrant une très bonne quantification de la toxine dans ces matrices complexes.

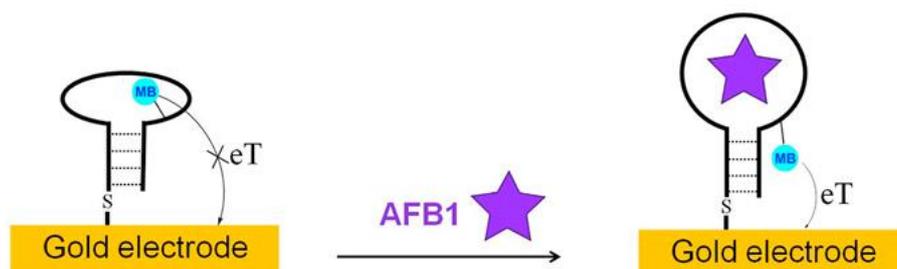


Figure 19. Fonctionnement du capteur électrochimique en présence ou en absence d'Aflatoxine B1 appelé AFB1 [167]

II.3. Utilisation des aptamères ciblant les ions

Dans la partie précédente, nous nous sommes intéressés au développement et à l'utilisation d'OS spécifiques de molécules. Si pour l'extraction de molécules, il existe à ce jour de nombreux travaux permettant d'obtenir des informations concernant le développement de supports et de procédures d'oligoextraction, ceux portant sur les ions sont plus rares, voire inexistants pour certains ions métalliques ciblés dans ce travail. En effet, la majorité des travaux portant sur les aptamères ciblant les ions a concerné le développement de capteurs.

Les études relatives à l'utilisation d'aptamères spécifiques à Cd(II), Pb(II) et Cu(II) sont récapitulées dans les Tableaux 9, 10 et 11.

II.3.1. Séquences ciblant Cd(II)

Il existe plusieurs séquences décrites dans la bibliographie et regroupées dans le Tableau 9, permettant la reconnaissance des ions cadmium. Cependant, il convient de noter qu'à notre connaissance, ces séquences n'ont été décrites que dans le cadre de développement de capteurs et non pour des systèmes d'extraction. Seuls deux auteurs ont réalisé l'ensemble du processus SELEX permettant, à partir d'une banque d'oligonucléotides, d'identifier une séquence ayant une forte affinité pour la cible [168,169]. Ces dernières sont identifiées en gras dans le Tableau 9. La première séquence identifiée en 2014 (séquence 1 du Tableau 9) est composée de deux parties : la partie spécifique au cadmium, représentée en rouge, et la partie dite « constante » à toute la banque d'oligonucléotides, qui ne semble pas être responsable de l'affinité de l'aptamère pour Cd(II) [168]. Cette séquence a été identifiée par un procédé SELEX après 10 cycles de sélection positive ainsi qu'une sélection négative contre les ions Cu(II), Zn(II), Hg(II) et Ag(I). D'autres auteurs ont ensuite utilisé cette séquence telle quelle [170–173] ou en la modifiant. Les modifications peuvent être multiples : suppression totale [14] ou partielle [18,174,175] de la partie constante servant à l'immobilisation lors du procédé SELEX, étape souvent suivie par l'ajout de nucléotides [19–21,176,177].

Des auteurs ont même proposé un mécanisme de reconnaissance des ions Cd(II) par cette séquence 1, décrit en Figure 20 [174]. L'aptamère prendrait une structure tige-boucle contenant dans la boucle des bases thymine et guanine. La reconnaissance de Cd(II) serait alors due à l'affinité de ces bases pour ce métal et en lien avec la lacune d'électrons sur la couche extérieure du cadmium, qui peut alors être comblée par des interactions avec l'oxygène ou l'azote présent sur ces bases.

Tableau 9. Aptamères décrits dans la littérature ayant pour cible l'ion Cd²⁺ et utilisés dans des capteurs. Les séquences sélectionnées à l'issue du procédé SELEX sont indiquées en gras. Les éléments interférents lors de la mesure sont indiqués en gras.

N° séquence	Aptamères	Détection	Tampon de Sélection	K _d	Tampon de mesure/dilution	Gamme de linéarité	Autres éléments étudiés	Echantillon réel	Ref
1	A CCG ACC GTG CTG GAC TCT GGA CTG TTG TGG TAT TAT TTT TGG TTG TGC AGT ATG AGC GAG CGT TGC G	Colorimétrie	HEPES (50 mM) + NaCl (50 mM) + KCl (5 mM) + MgCl ₂ (5mM) pH 7,2	34,5 nM	Tampon MOPS + NaCl (50 mM), pH 7	0,5 - 45 µg/L	K, Ca, Mg, Hg , Zn , Pb , Fe, Ag, Co, Cu , Mn, Cr, Ba, Ni	-	[134]
		Mesure de Glycémie après conversion du sucrose en glucose par l'invertase dont le brin est complémentaire à l'aptamère	-	-	PBS (0,1 M) + NaCl (0,1 M), pH 7.3	2,3 ng/L - 22,5 µg/L	Pb, Hg, As, Fe, Cu, Cr, Zn, and Mn	Eaux de rivière, d'étang et du robinet	[173]
		Colorimétrie	-	-	Tampon PBS avec 0,05 % de Tween-20 et dilution de la solution de Cd dans tampon MOPS pH 7	1 - 500 µg/L	Hg , Pb, Fe, Mn, Mg, K, Ag, Cu, Al, Zn, Ca	Vin	[170]
			-	-	NaCl 6 %	2 – 20 µg/L	Pb , K, Cu, Ca, Mg, Na	-	[171]
		Electrochimie	-	-	PBS (NaH ₂ PO ₄ ; Na ₂ HPO ₄)	0,1 µg/L - 112,4 mg/L	Hg , Pb, Zn	Eaux de rivière	[172]

2	GG GGA CTG TTG TGG TAT TAT TTT TGG TTG TGC AGT	Fluorescence	-	-	Tampon HEPES, pH 7,3	0,8 µg/L - 0,6 mg/L	Na, Sr, Mn, K, Fe, Ca, I, Mg, Cr, Al, U, Zn, Hg, Pb, Ba, Tb, Cu, Ag	Sang humain et eaux de rivière	[176]
3	GGA CTG TTG TGG TAT TAT TTT TGG TTG TGC AGT ATG	Electrochimie	-	-	Tampon acétate (10 mM) + NaClO ₄ (10 mM), pH 4,5	28,1 - 112,4 µg/L	K, Ca, Mg, Hg, Zn, Pb, Fe, Ag, Co, Cu, Mn, Cr, As, Se	Eaux de distribution, salive synthétique	[174]
			-	-	PBS (10 mM), pH 7,45	2 - 100 µg/L	Ag, Mg, Pb, Zn, Cu, Cr, As, Ca, Mn, Se, Co	Eaux de mer, effluents industriels	[175]
		Photo-électrochimie	-	-	PBS (0,1 M), pH 7	0,6 ng/L - 2,2 µg/L	Ag, Hg , Cu, Fe, Pb , Ni, Se, Zn	Eaux de lac	[18]
4	ATG GGT CTC ACT ATG GGA CTG TTG TGG TAT TAT TTT TGG TTG TGC AGT ATG ACT A	Colorimétrie	-	-	Tris-HCl (20 mM) + NaCl (50 mM) + KCl (10 mM) + MgCl ₂ (10 mM), pH 7,4	1,1 ng/L - 112,4 µg/L	Hg, Pb, Cd, Ag, Zn, Mn, Ni, Cu	Eaux de distribution, de rivière, d'étang	[19]
5	GGA CTG TTG TGG TAT TAT TTT TGG TTG TGC	Fluorescence	-	-	NaCl pH 7-8	0,1 - 112 mg/L	Cu, Pb, Ag, Fe, Hg , As	Eaux de lac	[14]
6	GGG CTG GGA GGG TTG GGG TAT TAT TTT TGG TTG TGC CCT ATG	Colorimétrie	-	-	Tris-HCl (50 mM)	56 ng/L - 22,5 µg/L et 33,7 -112,4 µg/L	K, Ag, Na, Ni, Cr, Hg, Zn, Mg, Ca, Ba	Eaux du robinet, d'étang, de rivière	[20]
7	GGG AGG GAA CTG TTG TGG TAT TAT TTT TGG TTG TGC	Fluorescence	-	-	Tris-HCl (10 mM) pH 7,3	1,1 - 224 µg/L	K, Na, Ba, Ca, Mn, Ni, Fe, Mg, Zn, Hg, Pb, Cu	Eaux du robinet, d'étang, de rivière et de puit de mines	[177]

	AGT AGG GCG GG								
8	GGG GGG GGA CTG TTG TGG TAT TAT TTT TGG TTG TGC AGT	Electrochimie	-	-	Tris-HCl (10 mM), pH 7,4	0,1 µg/L - 0,1 µg/L	Zn, Pb, Mn, Co, Fe, Cu, Hg	Eaux de distribution, usées	[21]
9	CTC AGG ACG ACG GGT TCA CAG TCC GTT GTC	Fluorescence	Tris-HAc (20 mM) + NaCl (140 mM) + KCl (5mM) + MgCl ₂ (10 mM), pH 7,4	-	ND	0 - 0,1 mg/L	Ag, Hg, Ni, Ba, Ca, Co, Mn, Pb, Zn, Cu, Al	Eaux de lac	[169]
		Colorimétrie	-	-	Tris-HCl, pH 7,4	1 - 400 µg/L	K, Cr, Mn, Zn, Fe, Pb	Eaux et riz	[178]
10	AAA AAA AAA AAA AAA TTT TCG ACG GGT TCA CAG TCC GTT G	Interférométrie	-	220 nM	Tris-HCl + NaCl (150 mM), pH 7	3,6 µg/L - 7,3 mg/L	K, Na, Mn, Mg, Ni, Ca, Zn, Pb, Ba, Cu, Hg	Eaux du robinet	[179]

Note : HEPES : 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethane-1-sulfonic acid; MOPS : 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid ; PBS : phosphate buffer salin ; Tris-HCl : [tris(hydroxymethyl)aminomethane] and HCl.

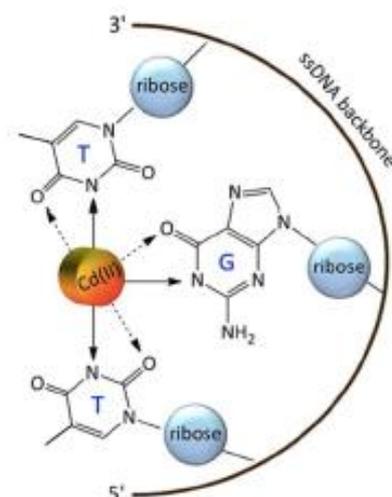


Figure 20. Proposition de mécanisme de rétention du cadmium sur la séquence 1 [174]

La seconde séquence (séquence 9 du Tableau 9) identifiée peu de temps après la première est, elle aussi, constituée de deux parties : la partie bleue, responsable du mécanisme de reconnaissance du Cd(II), et la partie noire, ajoutée pour le développement du capteur [169]. Cette séquence a été identifiée à la suite du procédé SELEX après 10 cycles de sélection positive ainsi que 4 cycles de sélection négative contre l'ion Zn(II). Cette seconde séquence, moins utilisée que la précédente par d'autres auteurs, a cependant été utilisée une fois telle quelle [178] mais aussi après modification de la partie 5' avec la suppression de la partie noire et l'ajout d'un groupement poly-A [179].

Les méthodes de détection mises en jeu dans les capteurs développés sont de nature variée, telles que la colorimétrie ou la fluorescence. Cela est réalisé par simple ajout, pour la plupart en 3' du brin, d'un groupement réactif tel que le bleu de méthylène [174] ou encore la 6-carboxyl fluorescéine (aussi appelée FAM) [169]. La détection électrochimique peut aussi être mise en œuvre.

On constate aussi que la plupart des mesures faites avec ces capteurs ont été réalisées dans des tampons de mesure différents de celui utilisé pour le SELEX. Il faut pour cela que ce tampon soit mentionné dans l'article en question, ce qui n'est pas le cas pour la seconde séquence. Cela pose une première question quant au choix qui devra être fait pour les conditions de percolation lors du développement d'une étape d'oligoextraction avec ces aptamères, la nature du tampon de percolation jouant un rôle fondamental sur les

performances analytiques attendues. En effet, ce dernier peut stabiliser ou déstabiliser la conformation de l'aptamère et donc modifier la rétention de la cible.

Les constantes de dissociation ont été déterminées pour chacune des deux séquences, à respectivement 34 nM et 220 nM. Il semble donc que la première séquence présente une affinité pour Cd(II) supérieure à la seconde, expliquant peut-être sa grande utilisation pour le développement de capteurs. Les gammes de linéarité observées pour les capteurs utilisant ces deux séquences s'étendent de quelques pg/L au mg/L. Cette large gamme s'explique notamment par des méthodes de détection plus ou moins sensibles.

De nombreux ions interférents potentiels ont été étudiés par les auteurs. Sur l'ensemble de ces ions, seuls ceux indiqués en gras ont également donné un signal au niveau du capteur. Il est à noter que la spécificité obtenue peut grandement être influencée par la méthode de détection mise en œuvre. On constate que dans le cas de la séquence 1, des interférences avec Hg(II), Pb(II), Cu(II) et Zn(II) ont été constatées par différents auteurs [14,18,21,134,170–172]. Afin d'éliminer ces interférences, l'un d'eux propose l'utilisation d'un complexant des métaux, l'acide nitrilotriacétique (NTA) [175]. En ce qui concerne la séquence 2, seule une interférence avec Cu(II) a été observée. Cependant pour l'ensemble de ces articles, aucune séquence contrôle n'a été étudiée. Il est donc impossible de savoir si la spécificité constatée par les auteurs est liée à la spécificité des aptamères ou à celle de la méthode de mesure. Comme expliqué précédemment, la spécificité lors du développement d'un support solide à base d'aptamère est l'un des paramètres clés à étudier. Une attention particulière devra donc être portée sur l'étude de la spécificité vis-à-vis de ces ions. L'utilisation d'une séquence contrôle semble aussi nécessaire afin d'évaluer si la rétention est due à des interactions non spécifiques ou spécifiques.

En ce qui concerne le type d'échantillons analysés, ils sont pour la plupart de nature environnementale, tels que les eaux potables, de rivières ou encore des eaux de rejet. Dans ces eaux, aucun des auteurs n'a rapporté de modification de la réponse du capteur par rapport à un milieu pur. Seuls deux travaux ont porté sur la détection de Cd(II) dans un milieu biologique, à savoir le sang humain [176] ou la salive synthétique [174]. Il est cependant à noter que les auteurs ayant travaillé sur le sang humain ont réalisé un prétraitement des échantillons par filtration suivie d'une dilution au 100^{ème} dans le tampon de mesure. Il a cependant été constaté par les auteurs une diminution de 36 % du rendement d'extraction

même après dilution de l'échantillon. Ceux travaillant sur la salive synthétique ont dilué l'échantillon au 2^{ème} dans le tampon de mesure.

Concernant la réutilisabilité des capteurs développés, seules deux études ont évalué ce paramètre. Dans la première, le dispositif a été réutilisé 3 fois sans diminution de la réponse mesurée [174]. Dans la seconde, 5 cycles de régénération ont été réalisés sur une période de 10 jours sans diminution de la réponse mesurée [21]. L'électrode était alors plongée pendant 10 min dans une solution de régénération constituée d'1 mM d'EDTA, 50 mM de NaCl et 10 mM de Tris-HCl. De plus, il est à noter que la fabrication du capteur a été réalisée 5 fois afin de vérifier que les résultats obtenus étaient similaires d'une fabrication à une autre.

II.3.2. Séquences ciblant Pb(II)

Tout comme pour Cd(II), plusieurs séquences présentant de l'affinité pour Pb(II) ont été décrites. L'ensemble des séquences est regroupé dans le Tableau 10. Dans un premier temps, on constate que la majeure partie des séquences décrites contiennent un motif de répétition contenant deux à trois guanines suivies d'une thymine (séquence 1-8 et 10 du tableau 10). Ce motif est connu pour former une structure tridimensionnelle appelée G-quadruplex, représentée en Figure 21. Elle est formée par empilement de structures G-quartet, constituées de 4 guanines interagissant par des liaisons hydrogène [180]. Cette structure peut être stabilisée par la présence de cations en son centre qui permet de réduire les répulsions électrostatiques entre les guanines [180]. Différents cations ont été étudiés, dont Pb(II). Il a été constaté que Pb(II) interagit fortement avec le motif G-quadruplex en stabilisant sa structure [181]. Par la suite, de nombreux auteurs, et notamment ceux apparaissant dans le Tableau 10, ont utilisé ce phénomène pour développer des capteurs reconnaissant Pb(II) mais aussi des systèmes d'extraction sur phase solide en mode dispersif. Cela explique donc pourquoi, pour ces séquences formant un motif G-quadruplex, la méthode traditionnelle de sélection par le processus SELEX n'a pas été mise en œuvre.

Tableau 10. Aptamères décrits dans la bibliographie ayant pour cible l'ion Pb^{2+} . Les séquences formant une structure G-quadruplex sont indiquées en gras. Les éléments interférents lors de la mesure sont indiqués en gras.

N° séquence	Aptamères	Application	Détection	Tampon de Sélection	K_d	Tampon de mesure/dilution	Gamme de linéarité	Autres éléments testés	Echantillon réel	Ref
1	<p>AAAAAAAAA</p> <p>A GGG TGG</p> <p>GTG GGT</p> <p>GGG T</p>	dSPE	GFAAS	-	-	Ajustement à pH 6 avec NaOH (0,1 M)	0,5 - 8 $\mu\text{g/L}$	K, Na, Ca, Mg, Zn, Fe, Al, Cu, Ni, Ba, Co	Sang et eaux de distribution et de lac	[182]
2	<p>GGG TGG</p> <p>GTG GGT</p> <p>GGG T</p>	Capteur	Electrochimie	-	-	Tris-HCl (10 mM) + KCl (1 mM), pH 8	2,1 $\mu\text{g/L}$ - 10,4 ng/L	Ca, Mg, Zn, Fe, Cd, Al, Ni, Cu, Mn, K, Ag, Hg	Eaux de distribution, de rivière	[183]
				-	-	PBS, pH 7,4	0,1 - 10,4 $\mu\text{g/L}$	Co, Zn, Ni, Cu, K, Sn	Eaux de distribution, sérum	[184]
				-	-	Tris-HCl (20 mM), pH 7	33,2 $\mu\text{g/L}$ - 33,2 ng/L	Co, Zn, Mg, K, Ag, Cu, Ni, Ca, Hg, Cd, Mn	Eaux de distribution, de rivière	[185]
				-	-	PBS : KCl (0,1 M) + KH_2PO_4 (0,1 M) + Na_2HPO_4 (0,1 M)	20,7 $\mu\text{g/L}$ - 20,7 $\mu\text{g/L}$	Ca, Mg, Hg, Cu, Cd, Ba, Zn	Eaux de distribution, de rivière	[186]
			-	-	PBS : $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (10 mM) + NaCl (0,3M), pH 7	20,7 ng/L - 2,1 $\mu\text{g/L}$	Ag, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, Hg, Ni, K	Eaux de rivière	[187]	
			-	-	PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) pH 7,4	2,1 - 90,1 $\mu\text{g/L}$	Ag, Fe, Ca, Co, Cu, Hg, Cd, Ni, K, Mg, Zn, Ba, Fe	-	[188]	

			Ampérométrie	-	-	Tris-HCl (20 mM) + NaCl (0,2 M), pH 7	0,2 µg/L - 0,2 mg/L	Co, Cu, Zn, Ca, Mg, Cd, Ni, Mn, Ag, Hg, K	Eaux de rivière	[13]
3	TT GGG TGG GTG GGT GGG T	Capteur	Photo-électrochimie	-	-	PBS : Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (10 mM) + NaCl (0,1M), pH 7,4	20,7 ng/L - 10,4 µg/L	Na, K , Zn, Ni, Fe, Co, Al, Mg	Eaux de distribution, de lac	[189]
4	T TTT TAC CCA GGG TGG GTG GGT GGG T	dSPE	ICP-MS	-	-	Ajustement du pH à 7 avec NaOH	0,3 - 867,5 µg/L	Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Ni, Mn, Cd, Hg	Sang et urine	[15]
		Capteur	Electrochimiluminescence	-	-	PBS (0,1 M) + K ₂ S ₂ O ₈ (0,1 M) + KCl (0,1 M) pH 7,4	41,2 ng/L - 10,4 µg/L	Na, K , Cu, Ca, Mn, Bi, Li, Hg	Urine et eaux de rivière	[190]
5	TT TTT TAC CCA GGG TGG GTG GGT GGG T	Capteur	Piézo-électrique	-	-	HEPES (25 mM) + NaCl (0,1 M), pH 7,4	1 - 41,4 µg/L	Cd, Hg, As, Cu	-	[191]
6	GGT TGG TGT GGT TGG	dSPE	FAAS	-	-	PBS (0,1 M), pH 7,4	33 - 1000 µg/L	Na, Li, K, Ni, Cu, Co, Ca, Zn, Ba, Cd, Cr, Al, Fe	Eaux de distribution, de mer	[192]
		Capteur	Fluorescence	-	-	Tris-HCl, pH 3,24	0,1 - 95,3 µg/L	K, Ca, Zn, Cl, Cu, Na, Fe, Cr, Ba, Mg, Hg, Al, Co	Urine, eaux d'étang, usées	[193]
			Diffusion par resonance	-	-	PBS : Na ₂ HPO ₄ (200 mM) NaH ₂ PO ₄ (200 mM) pH 7,4	2.9 ng/L - 8.7 µg/L	Al, Co, Zn, Ca, Cu, Mo, Mn, Ba, Fe, Li, Sn, K, Hg, Ag ⁺ , Mg	Eaux usées	[194]

			Infra-rouge	-	-	Tris-HCl (20 mM), pH 7,4	20,7 µg/L - 2,1 mg/L	-	-	[195]
7	C AAC GGT TGG TGT GGT TGG	Capteur	Electrochimie	-	855 nM	HEPES (50mM) + MgCl ₂ (3 mM) + NaCl (120 mM) + KCl (5 mM)	0,1 - 1000 µg/L	Zn, Cu, Cd, Hg	-	[196]
			Fluorescence	-	-	MOPS (10 mM) + NaNO ₃ (50 mM), pH 7	4,1 - 31,1 µg/L	Mg, Cd, Ce, Co, Cu, Ni, Fe, Mn, Zn, Hg, Ag	-	[197]
8	GTG GGT AGG GCG GGT TGG	Capteur	Colorimétrie	-	-	HEPES (20 mM) + NaCl (25 mM), pH 7,4	2,1 - 103,6 µg/L et 0,1 - 5,2 mg/L	Ca, Co, Cu, Ba, Ni, Hg, Zn, Cd	Eaux de lac, échantillon de sol	[12]
			Fluorescence	-	-	NaCl pH 7-8	0,2 - 207 mg/L	Cu, Cd, Ag, Fe, Hg, As	Eaux de lac	[14]
			Photo- luminescence	-	-	HCl 7 %	99,5 ng/L - 0,3 mg/L	Mn, Mg, Cd, Ca, Na, Cu, K, Zn, Hg, Ag, Co, Ni, Fe,	Eaux de distribution, de rivière	[198]
9	CTC AGT CGA CGA CGG CCA GTA GCT GAC ATC AGT GTA CGA TCT AGT CGT CGA	Capteur	Fluorescence	Tris-Hac (20 mM) + acétate de sodium (10 mM), pH 7,4	760 ± 180 nM	Tris-Hac (20 mM) + acétate de sodium (10 mM), pH 7,4	20,7 µg/L - 0,2 mg/L	Mn, Al, Cu, Co, Zn, Ca, Ba, Cd, Hg, Ni	Eaux de lac, sérum bovin	[199]
10	GGT GGT GGT GGT TGT GGT GGT GGT GG	Capteur	Electrochimie	-	-	PBS (10 mM) ou Tris-HCl (10 mM), pH 7,4	0,2 pg/L - 0,2 µg/L	Cd, Co, Ag, Cu, Mg, Ni, Zn, Fe	Eaux de distribution, usées, de vallée	[200]

11	GTA GAG AAG GAT ATC ACT CAT TTT TTT TTT TGA GTG ATA AAG CTG GCC GAG CCT CTT CTC TAC	Capteur	Electrochimie	-	-	Tris-acetate (50 mM) + NaCl (50 mM), pH 7,5	0,1 µg/L - 1 mg/L	Mn, Hg, Zn, Cu, Ca, Mg, Cr, Cd, Ag, Fe, Ni, Co	Eaux de lac	[201]
12	TTT TTT CGA TAA CTC ACT ATA GGA AGA GAT G	Capteur	Electrochimie	-	-	PBS : Na ₂ HPO ₄ (100 mM) + KH ₂ PO ₄ (100 mM), pH 7,4	1 ng/L - 0,4 mg/L	Cu, Fe, Hg, Zn, Al	Eaux de distribution, de lac	[202]

Note: dSPE : dispersive solide phase extraction ; GFAAS : graphite furnace atomic absorption spectroscopy ; FAAS : Flame atomic absorption spectroscopy ; ICP-MS : inductively-coupled plasma mass spectrometry ; HEPES : 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethane-1-sulfonic acid; MOPS : 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid ; PBS : phosphate buffer salin ; Tris-HCl : [tris(hydroxymethyl)aminomethane] and HCl.

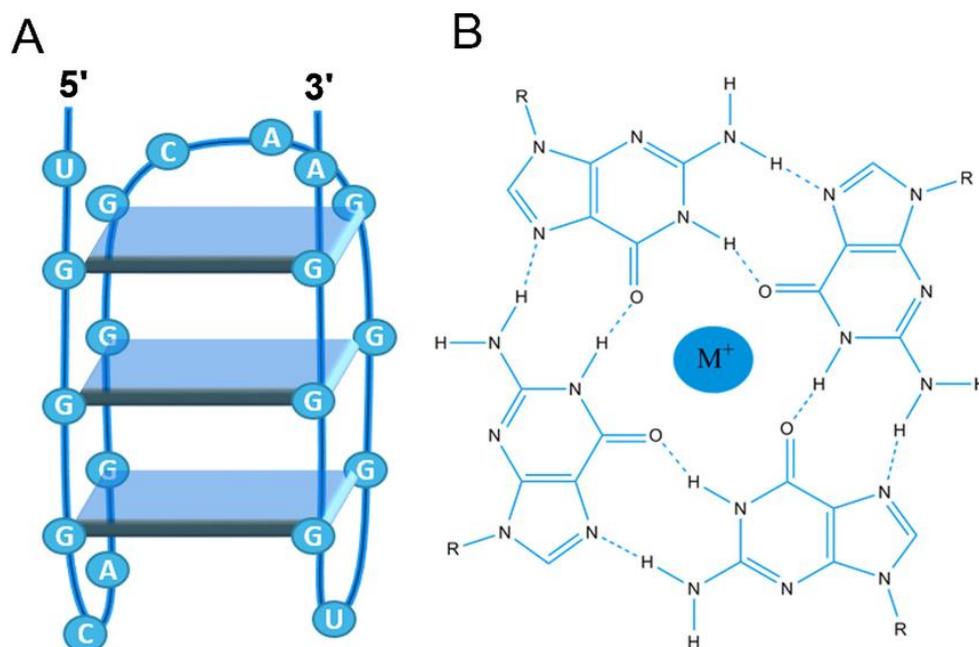


Figure 21. Structure G-quadruplex : (A) forme tridimensionnelle formée d'empilements de structures G-quartet (B) liaisons hydrogène formées sur un G-quartet et stabilisées par un cation [180]

Les gammes de linéarité sont encore une fois très variées, cependant la plupart d'entre elles se situent autour du $\mu\text{g/L}$ jusqu'à la centaine de $\mu\text{g/L}$, correspondant aux normes fixées dans plusieurs matrices et notamment dans les eaux destinées à la consommation humaine. Comme précédemment, des éléments ont été testés afin de vérifier les interférences possibles avec la mesure du Pb(II). Très peu d'éléments interférents ont été identifiés pour l'ensemble des séquences. Seule la séquence identifiée en vert semble reconnaître aussi Hg(II), Ag(I) et K(I). K(I) est notamment connu pour interagir avec les structures formant des G-quadruplex, cette interférence pouvait donc être attendue [203].

Les capteurs ont été appliqués, comme dans le cas de Cd(II), majoritairement sur des matrices environnementales, à savoir des eaux potables et de rivières. Les auteurs ont réalisé pour cela une filtration préalable de l'eau. Aucune différence d'intensité du signal n'a été constatée entre les échantillons synthétiques et les échantillons réels. Quelques applications en fluides biologiques ont été réalisées notamment dans l'urine [190,193] mais aussi dans du sérum bovin [199] et humain [184]. Dans le cadre de l'urine, dans l'une des études, une digestion préalable de cette dernière a été réalisée [193], alors que dans l'autre il s'agit d'une simple

filtration suivie d'une centrifugation [190]. Aucun effet de matrice n'a été constaté par les auteurs lors de la mesure sur capteurs. Pour le sérum, une filtration suivie d'une centrifugation ainsi que d'une dilution au 20^{ème} dans le tampon de mesure ont été réalisées [199]. Dans la seconde étude, les auteurs n'ont pas expliqué la méthodologie de pré-traitement de l'échantillon [184]. Aucun de ces auteurs n'a constaté d'effets de matrice lors de la mesure.

Il existe ici quelques développements de systèmes de dSPE utilisant des aptamères ciblant Pb(II) [15,182,192]. Les séquences utilisées étaient toutes constituées d'un motif de répétition de 2 [192] ou 3 [15,182] guanines. Pour ce faire, les aptamères ont été immobilisés sur des particules magnétiques, permettant une séparation simplifiée des ions libres ou liés aux aptamères. Des volumes de 5 mL à 25 mL d'échantillon ont été traités par l'introduction de quelques centaines de mg de particules d'OS. L'échantillon a été ensuite laissé en contact avec les particules pendant 15 à 35 min. Aucune solution de lavage n'a été utilisée. Les particules ont ensuite été séparées de l'échantillon puis placées dans une solution d'élution constituée d'EDTA [15], d'acide nitrique [182] ou d'acide chlorhydrique [192] avant de procéder à la détermination du Pb(II) extrait.

L'un des inconvénients majeurs des protocoles développés est le manque de réutilisabilité des supports puisque seule l'étude utilisant de l'EDTA comme solution d'élution a réutilisé ses supports par la suite, alors que les autres auteurs sacrifiaient leur support à chaque échantillon. De plus, la spécificité des supports étudiés ne correspondait pas à celle définie précédemment pour les molécules organiques. En effet, les auteurs ont ajouté d'autres ions que l'ion Pb(II) dans les échantillons et ont juste regardé si leur présence affectait la mesure de la concentration de Pb(II). Cela ne permet pas de déterminer si les autres ions testés étaient aussi retenus par le support. Ils n'ont pas plus étudié le comportement des ions sur un support de contrôle. Ce manque de données quant à la sélectivité de la procédure d'extraction souligne l'intérêt de compléter ces travaux.

Les matrices réelles étudiées sont ici des eaux telles que l'eau de mer ou de distribution mais aussi du sang et de l'urine humaine. Une première étude en dSPE a porté sur l'analyse de différents types d'échantillon, à savoir le sang mais aussi des eaux de lac et de distribution [182]. Le rendement d'extraction en milieu synthétique était de 100 % avec un facteur d'enrichissement de 17,73. Lors du passage en matrice réelle, et notamment pour le sang, une digestion micro-onde a été réalisée, suivie d'une dilution au 100^{ème}. Ainsi, le facteur

d'enrichissement atteint en milieu synthétique n'a donc pas été retrouvé pour les échantillons réels au vu de cette dilution. L'eau de lac ou de distribution ont quant à elles seulement été filtrées et leur pH ajusté. En ce qui concerne l'eau certifiée, cette dernière a été diluée mais l'on ne connaît pas le facteur de dilution. Lors de la mesure en GFAAS, aucun effet de matrice n'a été constaté, avec un rendement d'extraction compris entre 91 et 109 %.

Dans l'étude traitant du sang et de l'urine, un rendement de 100 % a été obtenu en milieu pur et avec un facteur d'enrichissement de 50 [15]. Cependant, ce facteur d'enrichissement a été abaissé lors du passage en matrices réelles, puisqu'une digestion assistée par micro-onde suivie d'une dilution du 5^{ème} au 25^{ème} ont été réalisées. Il est à noter que les auteurs ont réalisé le protocole sur du sang certifié afin de vérifier la suppression des effets de matrices en ICP-MS, sans pour autant comparer les résultats avec un extrait de digestion acide qui n'aurait pas subi le protocole de dSPE. Enfin, la réutilisabilité du support a été testée avec 8 cycles de régénération, sans préciser pour autant si cela a été réalisé après l'extraction d'échantillons réels.

En ce qui concerne l'étude utilisant comme matrice réelle l'eau de mer, seule une dilution dans le tampon de percolation a été réalisée avant l'extraction en dSPE [192]. Le facteur d'enrichissement théorique était de 17,37, mais sans que l'on connaisse exactement le facteur d'enrichissement pour les échantillons réels. Aucune perte de rendements d'extraction ni d'effets de matrice n'ont été constatés lors du passage en échantillon réel, que cela soit lors de l'extraction mais aussi lors de la mesure en spectroscopie à flamme.

II.3.3. Séquences ciblant Cu(II)

L'ensemble des séquences d'aptamères identifiées comme étant spécifiques à Cu(II) est regroupé dans le Tableau 11. Une grande partie d'entre-elles a été utilisée pour développer des capteurs. La première séquence décrite dans ce tableau a été identifiée suite à un procédé SELEX et utilisée pour le développement d'un oligoadsorbant utilisé en mode dispersif [16]. Par ailleurs, dans cet article, les auteurs ont décrit avec soin les conditions d'extraction telles que les milieux de dispersion et de désorption, les méthodes de régénération ou encore la spécificité du support de dSPE. En plus de démontrer la spécificité de cette séquence en

étudiant l'extraction d'ions interférents, les auteurs ont effectué des mutations et délétions sur cette dernière. Ils ont par la suite mesuré les K_D des séquences obtenues et ont émis une hypothèse sur les sites de reconnaissance du cuivre, identifiés en couleur sur la Figure 22. La constante de dissociation mesurée pour cette séquence est de 18 μM . Cette valeur, particulièrement faible, s'avère parfaitement adaptée au développement d'OS utilisé en mode non dispersif.

Les auteurs ont aussi étudié la sélectivité du support par l'utilisation d'un support contrôle non greffé avec des aptamères. Cu(II) n'a pas été retenu sur le support non greffé, ce qui traduit l'absence de rétention non spécifique sur l'agarose activé streptavidine utilisé comme support solide. Le support d'extraction développé a été appliqué à des eaux de drainage minier. Les échantillons ont pour cela subi un traitement par bioréacteur passif sulfato-réducteur sans que d'autres détails soient indiqués. Les rendements d'extraction en milieu pur ont été estimés à 90 %. Cependant, l'objectif de cette étude était d'éliminer le cuivre de l'échantillon. C'est pour cette raison que dans le cadre des échantillons réels, la mesure a été effectuée dans la solution issue de la percolation sur le support afin de s'assurer que le cuivre était bien resté fixé sur le support. Cette valeur étant très proche de zéro dans les échantillons de drainage minier, le cuivre était donc retenu à 100 % par les aptamères. Enfin, les auteurs ont étudié la réutilisabilité du support. Après 20 cycles d'utilisation, moins de 10 % de diminution du rendement a été observé, démontrant une bonne stabilité du support.

Une autre séquence, annotée ici comme séquence 4, a été identifiée à la suite d'un procédé SELEX [204]. Cette séquence n'a été mise en œuvre que dans des capteurs et la constante de dissociation mesurée est de 1,99 μM , ce qui est bien plus élevé que celle décrite pour la séquence 1 et peu compatible avec le développement d'un OS. Deux tampons de mesure différents (Tris-HCl et PBS) ont été utilisés avec succès pour le développement des capteurs. Il est à noter que cet aptamère a été appliqué à la reconnaissance de Cu(II) dans des échantillons de poissons, une matrice particulièrement complexe [205]. Pour cela, le poisson a été broyé et dilué dans le tampon de mesure. Le mélange a ensuite été centrifugé et filtré. La mesure par le capteur a été réalisée et comparée avec une mesure en ICP-MS. Aucune différence notable dans les concentrations mesurées par les deux dispositifs n'a été constatée.

En ce qui concerne l'ensemble des séquences décrites et leur utilisation, un tampon de mesure a particulièrement été utilisé, le PBS. Cependant, les compositions précises des PBS utilisés ne

sont pas toujours décrites. Cela est en effet constaté dans l'article décrivant la séquence 3. Il est cependant à noter que cette séquence a été appliquée sur des échantillons réels complexes comme le sang humain. Pour cela, le sang a été introduit dans un tube contenant un anti-coagulant. Par la suite, le mélange a été centrifugé, le surnageant récupéré et du PBS ajouté afin de réaliser l'extraction. Des rendements compris entre 92 % et 107 % ont été obtenus, confirmant qu'il n'existe pas d'effets de matrice lors de cette mesure.

Enfin, on constate que bien qu'un grand nombre d'éléments interférents probables aient été testés, aucun élément interférent lors de la mesure n'a été identifié pour l'ensemble des capteurs. Dans les articles portant sur le développement de capteurs, aucune séquence contrôle permettant l'étude de la sélectivité n'a été testée.

Tableau 11. Aptamères décrits dans la bibliographie ayant pour cible l'ion Cu^{2+} . Les séquences sélectionnées à l'issue du processus SELEX sont indiquées en gras. Les éléments interférents lors de la mesure sont indiqués en gras.

Numéro de séquence	Aptamères	Application	Détection	Tampon de Sélection	K_d	Tampon de mesure/dilution	Gamme de linéarité	Autres éléments testés	Echantillon réel	Ref
1	GG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAT ACC AGC TTA TTC AAT TCC CAG GCT TGG ATA GCA CAT TCA TGG CAG CGT TCT TTA CGA GAT AGT AAG TGC AAT CT	dSPE	ICP-MS	20 mM Na_2HPO_4 + 150 mM NaCl + 1 mM imidazole	18,3 pM	20 mM Na_2HPO_4 + 150 mM NaCl + 1 mM imidazole	1 - 300 mg/L	Mg, Na, Ni, Co, Ca, Fe, Mn, Cd, Zn	Eaux de drainage minier	[16]
2	GAA TTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA GAG ATG GCG ACT GTT TAG AAG CAG GCT CTT TCT TAT GCG TCT GGG CCT CTT TTT AAG AAC	Capteur	Electrochimie	-	-	-	0,007 – 635,5 $\mu\text{g/L}$	Ca, Co, Mg, Ni, Pb, Sn, Zn	Eaux de lac et de distribution	[17]
3	GGT GGT GGT GGT TGT GGT GGT GGT GG	Capteur	Fluorescence	-	-	PBS 10 mM	1,3 – 9,5 $\mu\text{g/L}$	Mg, Zn, K, Fe, Ca, Mn, Na, Cr	Sang humain	[206]

Numéro de séquence	Aptamères	Application	Détection	Tampon de Sélection	K _d	Tampon de mesure/dilution	Gamme de linéarité	Autres éléments testés	Echantillon réel	Ref
4	ATC GCG ATA TTT TCT GTA GCG ATT CTT GTT TGA GCG CTC GGT ACG AAC AGA	Capteur	Electrothermie	PBS	-	PBS	317,8 fg/L - 3177 µg/L	Pb, Hg, Cr, Mg, Fe, Al, As	Eaux de lac, de distribution et sols	[204]
		Capteur	Electrochimie	-	1,99 µM	Tris-HCl 0,01 M, pH 8	0,6 – 190,7 µg/L	Cr, Ba, K, Ni, Li, Co, As, Mg, Fe, Na, Ca	Poissons	[205]

Note: dSPE : dispersive solide phase extraction ; ICP-MS : inductively-coupled plasma mass spectrometry ; PBS : phosphate buffer salin ; Tris-HCl : [tris(hydroxymethyl)aminomethane] and HCl.

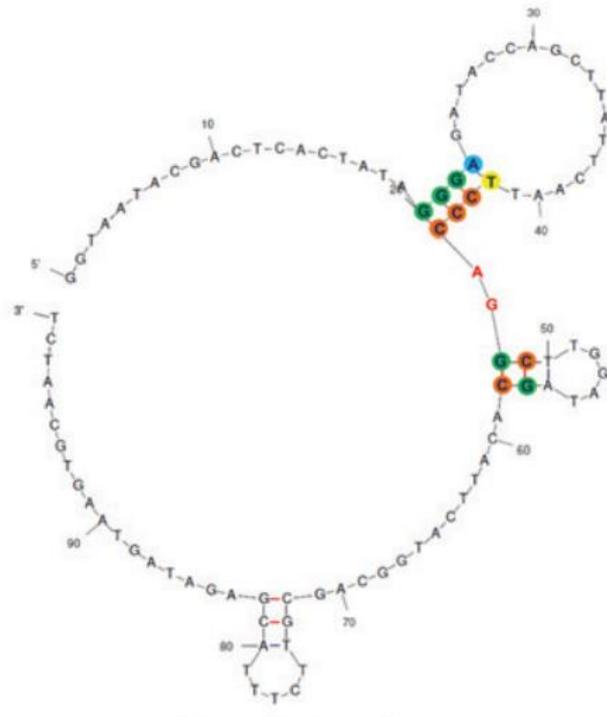


Figure 22. Modélisation de la séquence 1 proposée par les auteurs et identification des sites de rétention [16]

II.4. Conclusion

Dans ce chapitre, une description détaillée de la nature des aptamères ainsi que de leur mode de sélection par le procédé SELEX a été réalisée. Par la suite, l'application des OS à l'extraction de molécules a été décrite, permettant de mieux appréhender les paramètres clés liés à l'utilisation d'aptamères comme éléments de reconnaissance sélectifs greffés sur un support solide. Il s'est avéré que le choix du support d'immobilisation, sa nature comme sa fonctionnalisation, ainsi que le choix du bras espaceur peuvent modifier les performances du support. Le choix des milieux de percolation, de lavage et d'élution sont aussi des paramètres influençant de manière significative les performances finales du processus d'extraction.

Parmi celles-ci, on peut évoquer la sélectivité du support. Cette sélectivité peut être étudiée en utilisant en parallèle un support de contrôle qui est le même support solide soit non greffé, soit greffé avec une séquence ne retenant théoriquement pas l'ion cible. L'utilisation d'un support contrôle greffé devrait dans le cas de l'extraction des ions permettre d'étudier la sélectivité en prenant en compte la présence de groupements phosphate sur le squelette de l'aptamère pouvant réaliser des interactions électrostatiques non spécifiques avec les cations métalliques ciblés dans notre étude.

L'étude bibliographique portant sur l'utilisation d'aptamères pour la reconnaissance et le piégeage des ions ciblés dans cette étude a montré que, pour Cd(II), aucun OS n'a été décrit. Pour Pb(II) et Cu(II), très peu d'OS ont été décrits et ces derniers ont tous été mis en œuvre en mode dispersif et sans l'utilisation en parallèle de supports de contrôle permettant de vérifier que l'extraction était bien liée à l'affinité des aptamères pour leur cible. Il a également été constaté, pour Cd(II) et Pb(II), que les milieux de mesure et/ou d'extraction sont nombreux et très divers en termes de composition et de force ionique. Il sera donc nécessaire de réaliser une étude approfondie du choix des milieux de percolation et de lavage, qui influencent la conformation et donc à priori l'affinité de l'aptamère et donc la rétention de la cible. De plus, la composition du milieu peut influencer la spécificité constatée puisque certains éléments présents dans le milieu de percolation mais aussi de lavage peuvent entrer en compétition avec les éléments interférents. Il est aussi constaté que les taux de greffage sur les billes magnétiques utilisées en dSPE n'ont jamais été déterminés. De plus, on constate que sur le peu d'articles traitant d'extraction et non de développement de capteurs, seuls deux articles

donnent une valeur de capacité pour les supports développés : 7,194 mg/g de support, calculée de manière théorique par le modèle de Langmuir pour le plomb [182] et 0,1 mg pour 200 μ L de support, déterminée expérimentalement pour le cuivre [16]. La capacité du support permettant de connaître la quantité maximale d'analyte pouvant être retenu sur le support, il paraît primordial de déterminer cette valeur théoriquement et expérimentalement dans le cadre de notre développement analytique.

Enfin, dans l'ensemble de la bibliographie sur les trois ions cibles, les applications ont surtout été réalisées sur des eaux environnementales. L'étude de matrices biologiques constitue donc un enjeu analytique supplémentaire. De plus, très peu d'études de la répétabilité et de la stabilité des mesures ont été réalisées. Si les capteurs s'avèrent être à usage unique, les temps de synthèse ainsi que la complexité de ces dernières s'avèrent être une grande contrainte de ce type de dispositif.

L'étude de la bibliographie concernant l'identification des séquences spécifiques au Cd(II), Pb(II) et Cu(II) couplée aux connaissances acquises dans le cadre de l'oligoextraction de molécules nous permet cependant d'envisager le développement de supports solides fonctionnalisés par des aptamères pour l'extraction de ces ions dans des matrices complexes.

Chapitre III

Développement de supports fonctionnalisés par des aptamères pour l'extraction du cadmium d'échantillons de sérum

Chapitre III - Développement de supports fonctionnalisés par des aptamères pour l'extraction du cadmium d'échantillons de sérum

Dans les chapitres précédents, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, aux méthodes de quantification des ions métalliques ainsi qu'à l'utilisation de la SPE comme méthode de purification et de préconcentration de l'échantillon. Après avoir conclu quant à la faible spécificité des supports conventionnels, l'utilisation de supports hautement spécifiques a été détaillée. Dans un second temps nous nous sommes intéressés aux aptamères, dont les performances ne sont plus à démontrer dans le cadre de l'extraction de molécules organiques. Enfin, une recherche bibliographique des séquences décrites pour les cibles a permis de conclure que pour le cadmium, à notre connaissance, aucune séquence n'avait été utilisée pour le développement de supports de SPE. En effet, seuls des capteurs ont été développés avec les séquences décrites dans la littérature. Deux groupes ont réalisé l'ensemble du processus de sélection, aboutissant pour chacun à l'identification d'une séquence spécifique au cadmium. Ces deux séquences ont, par la suite, été réutilisées et modifiées afin de correspondre au mode de détection mis en œuvre pour le développement de capteurs variés. L'ensemble des modifications apportées à la première séquence décrite sont représentées en Figure 23.

Il existe cependant un certain nombre d'interrogations à l'issue de la lecture de la bibliographie avant d'utiliser ces séquences comme support d'extraction, tel que le milieu de percolation à utiliser, puisqu'un grand nombre de tampons de mesure différents ont été décrits. De plus, la sélectivité des séquences n'a pas été étudiée via l'intégration dans ces travaux d'une séquence contrôle.

Dans ce chapitre le développement d'un nouveau support d'extraction à base d'aptamères a été réalisé via l'étude détaillée des deux séquences décrites dans la littérature.

Ce chapitre se présente sous la forme d'un article rédigé en anglais, publié dans *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* : « Novel oligonucleotide-based sorbent for the selective extraction of cadmium from serum samples » Fanny Gignac, Nathalie Delaunay, Valérie Pichon.

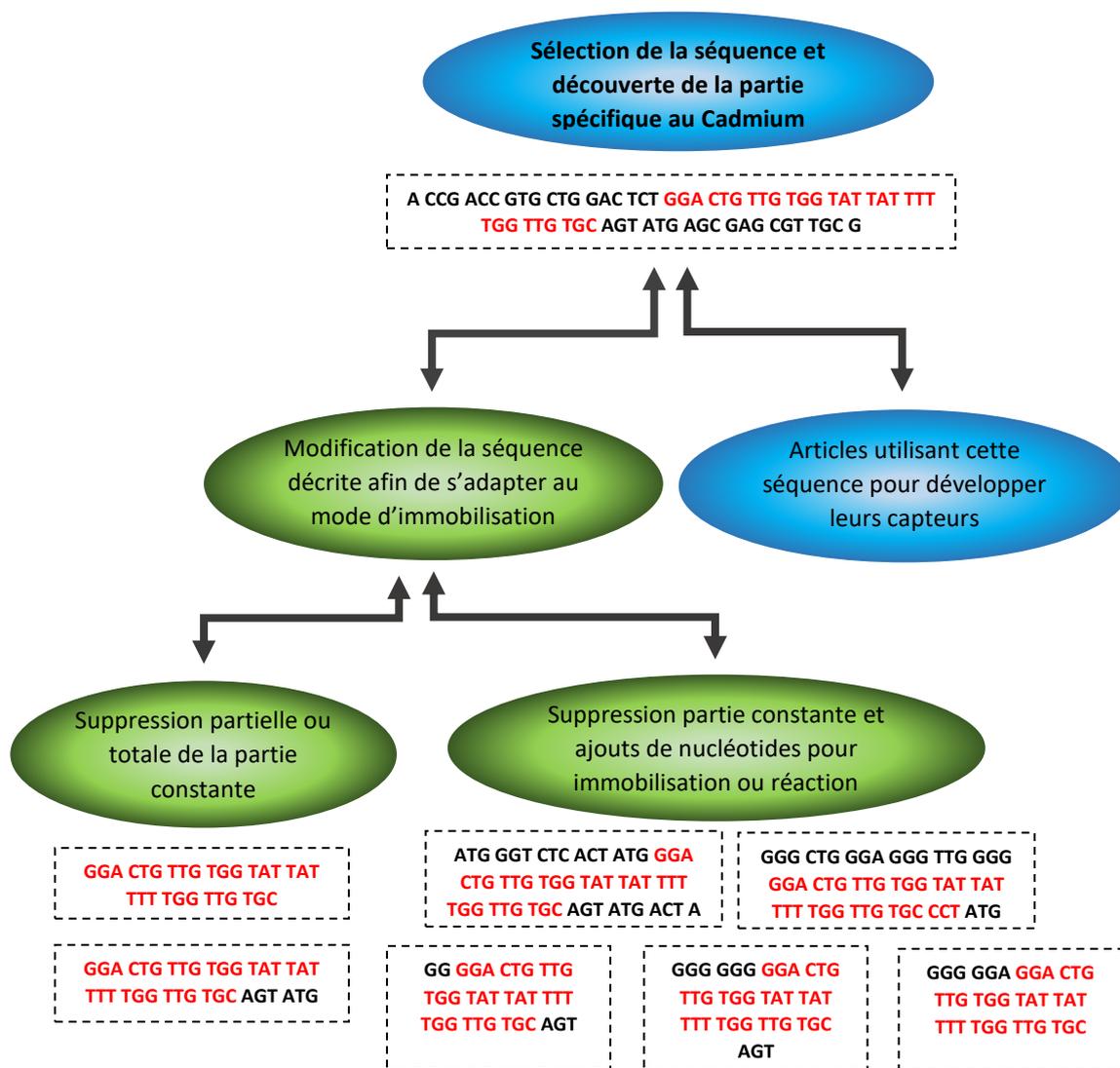


Figure 23. Représentation schématique des modifications apportées à la séquence 1 [14,18–21,134,170–177]

Article 1 - Novel oligonucleotide-based sorbent for the selective extraction of cadmium from serum samples

Fanny Gignac ^a, Nathalie Delaunay ^a, Valérie Pichon ^{a,b,*}

^a Department of Analytical, Bioanalytical Sciences, and Miniaturization, UMR 8231 Chemistry, Biology and Innovation, ESPCI Paris, PSL University, CNRS, 10 rue Vauquelin, Paris 75005, France

^b Sorbonne Université, Paris 75005, France

Abstract

The objective was to develop a sorbent functionalized with aptamers for the selective extraction of cadmium from biological samples. Two oligonucleotide sequences reported in literature as specific to cadmium were covalently grafted on activated Sepharose, with grafting yields of 45%. Once the supports packed in cartridges, a thorough study of the percolation conditions favoring Cd(II) retention was performed, demonstrating the importance of the nature of this medium. A high selectivity was reached when applying the optimal conditions as a recovery of 85% was obtained using the sorbent functionalized with one of the specific aptamers and only 1% on the control sorbent grafted with a scramble sequence. A high specificity was also obtained as recoveries for most of other ions were lower than 15%. The capacity of this oligosorbent estimated to 180 ng of Cd(II) for 30 mg of support was perfectly adapted to the trace analysis of Cd(II). The extraction procedure was then applied to a serum sample which was first subjected to acid digestion. The initial concentration of cadmium in the serum was estimated to 1.83 µg/L using standard addition method and an extraction yield of $75 \pm 1.6\%$ was measured. Comparison of these results with those obtained without oligoextraction (recovery of 57%) showed a significant reduction of matrix effects in ICP-MS thanks to the use of the oligosorbent, underlining its interest for a more reliable quantification of Cd(II). This result was confirmed by performing the oligoextraction protocol on a certified serum.

Keywords: Solid-phase extraction; Aptamers; Oligoextraction; Cadmium; ICP-MS

* Corresponding author: e-mail address: valerie.pichon@espci.fr (V. Pichon)

III.1. Introduction

Cadmium is a naturally occurring metal, which belongs to the class of transition metals. It is now considered as one of the most toxic metals to humans. It is recognized as carcinogen [207] and can cause tissue damage by creating oxidative stress [208,209]. It can also compete with other ions, such as Fe(II) and Zn(II) [210], and disrupt their mechanisms of physiological action on the human body. Cadmium is commonly used for anthropogenic activities such as Nickel-Cadmium batteries or paint pigments [211]. The main source of population exposure to cadmium is the ingestion of cigarette smoke [212]. In order to monitor accidental exposure of the population, some countries have set levels of cadmium concentration to be found in the blood [213], which is 4 µg/L in France, for example [4].

Cadmium trace analysis is typically performed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [214]. However, matrix effects can compromise the accuracy of the results obtained with this instrument especially when dealing with complex samples such as biological fluids. In order to overcome these problems, a sample treatment technique is mandatory before the ICP-MS measurement. Solid phase extraction (SPE) is by far the most used technique to purify and preconcentrate ions in order to quantify them at the trace level [215]. Conventional sorbents such as cation exchange resins [216] have been largely used but their specificity is limited as some other cations are co-extracted. In order to overcome this lack of specificity, new highly specific and selective supports have been developed such as ion-imprinted polymers (IIPs) [83,84]. They are synthetic supports with cavities allowing a selective trapping of the target ion. The potential of IIPs has been largely demonstrated [8] but their synthesis remains a complex step in analytical development.

The objective of this study is to investigate the potential of aptamers to specifically and selectively extract cadmium from complex samples. Aptamers are single-stranded DNA or RNA (typically 20 to 110 bases) that have a specific and high affinity for molecules or ions. They are identified by a complex process called SELEX for Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment [217]. Aptamers immobilized on solid supports have been widely reported for the extraction of molecules, from small drugs to proteins [10,11,101], but little for the extraction of ions. Concerning cadmium, cadmium-specific oligonucleotide sequences

have been identified and applied to develop specific sensors [14,18–21,134,169–172,174,176,177,179].

A first cadmium-specific sequence, characterized by a dissociation constant of 34 nM and composed of a so-called specific sequence placed between two non-specific sequences at the 5' and 3' ends, was described for the development of a sensor [134]. This sequence was further modified at the 3' and/or 5' ends by deleting the non-specific part or by adding nucleotides or chemical groups to modify the sensor detection mode [14,19,21,174,176]. Some of the authors [18,174] deleted the non-specific part in 5', but kept it partially in 3' (the first 6 nucleotides) to improve the sensor sensitivity. Once the sensors developed, they were applied to the determination of cadmium in tap and river waters. A second cadmium-specific sequence, characterized by a dissociation constant of 220 nM [179], was reported [169]. During SELEX, after having identified several sequences showing some affinity for cadmium, a negative selection round was performed to eliminate the sequences with an affinity for zinc, chosen because of its similar chemical behavior to cadmium in solution. The sequences identified during the SELEX process were then compared in terms of affinity using circular dichroism and one of them was selected for the development of a light-up biosensor.

These two sequences were thus considered here to develop for the first time oligosorbents (OSs) to be used as cadmium-selective extraction sorbent. After grafting the reported sequences on CNBr-activated Sepharose and measuring the grafting yields, the performances of the two resulting OSs were evaluated and compared in terms of affinity, selectivity and specificity. The optimization of the percolation, washing and elution media allowed to demonstrate their strong influence on the affinity of the OS for Cd(II), i.e. on its retention. To evaluate the selectivity of the retention process, the behavior of Cd(II) on a given specific oligosorbent was compared to that of a support grafted with the same sequence but scrambled acting as a control OS. Based on selectivity toward the control OS and specificity towards other ions, one of the two specific OSs was selected. Once the extraction protocol was optimized, the performance of this specific OS was determined in terms of capacity and specificity towards several other cations. Finally, the protocol was applied to extract Cd(II) from spiked and certified serum samples before its analysis in ICP-MS and the results were compared with the ones corresponding to the analysis of the samples not submitted to oligoextraction.

III.2. Experimental

III.2.1. Reagents and samples

Metal standards (in 2% nitric acid), Trizma hydrochloride (Tris-HCl), ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt (EDTA), sodium phosphate dibasic, sodium dihydrogen phosphate dihydrate, sodium acetate, sodium chloride, magnesium chloride, Trizma buffer, 65% nitric acid, triethylamine (TEA), glacial acetic acid, human serum, and CNBr-activated Sepharose (4B, 90 μm) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Acetonitrile (ACN) was obtained from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). Hydrochloric acid 32% was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Serum certified for trace elements was obtained from UTAK (Santa Clarita, California, USA). The serum comes from lot C9377, which has a certified cadmium value of 8 $\mu\text{g/L}$ with an uncertainty of $\pm 1.2 \mu\text{g/L}$. High-purity water was obtained using a Milli-Q purification system (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). The ICP-MS was daily tuned using an Agilent tuning solution (Ce, Co, Li, Mg, Tl, and Y at 1 $\mu\text{g/L}$ in 2% HNO_3 (Les Ulis, France)). 5'-amino-modified with C_6 spacer arm DNA oligonucleotides (sequences 5'-GGACTGTTGTGGTATTAT TTTTGGTTGTGCAGTATG-3' for AC1, 5'-ATGATTGATGTTAGGTGTTAGTTGCTCGTTGTG TGT-3' for scramble AC1 (named c1), 5'-CTCAGGACGACGGGTTCA CA GTCCGTTGTC-3' for AC2, and 5'-GATGAAGTGCAGTGCTTGCTCACCGCCCTG-3' for scramble AC2 (c2)) were synthesized and purified by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) from Eurogentec (Angers, France). The sequence modeling was done thanks to Mfold web server provided by M. Zuker.

III.2.2. ICP-MS

The determination of ion concentrations in solutions was performed with an ICP-MS 7850 from Agilent Technologies (Les Ulis, France) equipped with a glass MicroMist nebulizer and a quartz Scott spray chamber with an ASX-500 autosampler. The parameters applied during the measurement were as follows: RF power, 1550 W; sampling depth, 8 mm; plasma gas flow rate, 15 L/min; auxiliary gas flow rate, 0.9 L/min; Helium flow rate, 4.3 mL/min. During the

daily performance check, the monitoring of ^7Li , ^{89}Y , ^{205}Tl , CeO/Ce ratio and Ce^{2+}/Ce ratio was carried out in order to ensure constant performances on all measurements. The limit set for ratios was $\text{CeO}/\text{Ce} \leq 1.2\%$ and $\text{Ce}^{2+}/\text{Ce} \leq 2\%$. The measurements were carried out with five replicates with 100 sweeps per replicate with an integration time of 1 s. The isotopes measured for the tested ions is: ^{24}Mg , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{111}Cd , ^{208}Pb , ^{207}Pb , and ^{208}Pb . All the samples were diluted to 1/10 in 2% HNO_3 before ICP-MS measurement. To quantify ions in the different solutions, calibration curves were daily studied between 5 ng/L and 5 $\mu\text{g}/\text{L}$. The limit of quantification (LOQ) was determined by measuring 10 blank solutions (HNO_3 2%). The equation described in Equation S1 (see Supplementary data) was then applied and the calculated LOQ value for Cd(II) was 4.2 ng/L. The LOQ values for the interfering ions were determined using the same method and are given in Table S1 (see Supplementary data). Another method was also used for determining the Cd(II) LOQ. It consisted of studying the calibration curve and determining the relative standard deviation (RSD) values obtained using 3 independent solutions for each concentration level and of considering a concentration level as quantifiable when the RSD values are lower than 5 %. Results are reported in Table S2. The minimum quantifiable concentration for Cd(II) was 5 ng/L, that is in good agreement with the previously calculated LOQ of 4.2 ng/L.

III.2.3. LC-UV analysis of aptamer

This method was adapted from previous studies realized by our group [155]. Grafting yields were determined by analyzing aptamer content in the solutions recovered after the grafting procedure by ion pair RP-HPLC-UV (Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography) using an Agilent 1200 series HPLC system equipped with an 1100 series autosampler and a 1200 series UV detector. The aptamers were monitored at 260 nm. The separation was achieved on a Kinetex core shell C18 column (150 x 3 mm i.d., 5 μm , 100 Å) from Phenomenex (Le Pecq, France) at 50°C. The column was connected to a precolumn filter (0.5 μm frit, 2.39 x 1.65 mm, Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA). The mobile phase was composed of water with 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA, prepared with TEA and acetic acid) pH 7 and acetonitrile. The gradient applied is as follows: 7% ACN for 5 min then a ramp of 15% ACN

is performed in 15 min, 15% ACN is then maintained for 5 min before re-equilibrating the column to 7% ACN during 10 min. The flow rate was set at 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ and the injected volume was 20 μL . Before sample injection, a calibration range for each aptamer sequence was performed from 0.1 to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 200 mM Na_2HPO_4 and 5 mM MgCl_2 .

III.2.4. Oligosorbent synthesis

The procedure used to immobilize aptamers on CNBr-activated Sepharose has been previously described by our group to develop OS for organic molecules [155]. Briefly, prior to immobilization, the aptamers were dissolved at 1 g/L in a buffer (200 mM Na_2HPO_4 and 5 mM MgCl_2 , pH 8) and denatured by heating at 75°C for 5 min. The solution was then left at room temperature for 30 min. CNBr-activated Sepharose (30 mg) was swollen and washed 6 times with 1 mM HCl and then rinsed with 1 mL of ultrapure water. The aptamer solution (150 μL) was then mixed with the Sepharose gel overnight at room temperature. The oligosorbent was then placed in a 1 mL SPE cartridge between two frits and washed 3 times with 1 mL of 200 mM Na_2HPO_4 pH 8. These washing solutions were recovered and diluted in 200 mM Na_2HPO_4 and 5 mM MgCl_2 in order to measure their content in non-grafted aptamers and then to calculate the grafting yield for each support. A 0.1 M Trizma solution was percolated through the cartridge during 2 h to block the remaining active groups of Sepharose. Finally, the OS was washed 3 times alternately with 2 mL of an acetate buffer (0.1 M acetate + 0.5 M NaCl, pH 4) and 2 mL of a Trizma buffer (0.1 M + 0.5 M NaCl, pH 8). The sorbents were conditioned with 5 mL of ultrapure water. The different oligosorbents synthesized in this study are called OS1 (oligosorbent grafted with the sequence AC1), OS2 (oligosorbent grafted with the sequence AC2) and OSc1 and OSc2 for the non-specific OS grafted with the respective c1 and c2 scramble sequences.

III.2.4. Extraction procedure

III.2.4.1. Pure media

Before each extraction, the OS was conditioned with 5 mL of the tested buffer. The percolation solution consists of the tested buffer spiked at 30 µg/L with Cd(II) and eventually other ions (each at 30 µg/L) to study the specificity. The sorbent was further washed with the same tested buffer. Finally, elution is performed with 2 x 500 µL of 1 mM EDTA. All these steps were performed with solutions maintained at 4°C. Each SPE fraction (percolation, washing and elution) was then diluted 1/10 in 2% HNO₃ for ICP-MS analyses. After determining the optimal percolation medium (25 mM Na₂HPO₄ + 25 mM NaH₂PO₄ + 150 mM NaCl), the capacity of the most promising OS was determined using the same protocol described above but by percolating 1 mL containing increasing amounts of Cd(II) from 30 to 600 ng on the OS. The elution fractions were then diluted in 2% HNO₃ with a dilution factor adapted to the introduced amount of Cd(II) to be in the calibration curve range.

III.2.4.2. Serum samples

A first step of acid digestion of the serum samples was performed to eliminate proteins that may complex cadmium. For this, 500 µL of serum (spiked or non-spiked) were introduced in an Eppendorf tube and mixed with 30 µL of 65% HNO₃. The mixture was centrifuged (10 min, 12 000 rpm) and the supernatant was then recovered and submitted again to centrifugation (10 min, 12000 rpm). The resulting supernatant was placed in a 5 mL polypropylene tube to be diluted with 4.5 mL of buffer (25 mM Na₂HPO₄ + 25 mM NaH₂PO₄ + 150 mM NaCl, pH 6.6). The pH was adjusted to 6.6 with 2 M NaOH. The optimized oligoextraction protocol was applied on 1 mL of treated serum sample. After oligoextraction, the elution fractions were diluted 1/10 in 2% HNO₃ and analyzed by ICP-MS. The determination of cadmium concentrations was done thanks to a calibration curve performed before each sequence (an example is provided in Figure S1). To demonstrate the potential of oligoextraction, the non-certified serum was spiked at concentrations of 2, 4 and 30 µg/L of Cd(II) and the content of serum sample determined after oligoextraction was compared to the Cd(II) content determined after the analysis of a serum sample only submitted to an acid digestion and a dilution step (dilution rate of 50 in order to obtain the same dilution factor as after the oligoextraction). Two replicates were performed for each spiking level. The same protocol was also applied to the certified serum.

III.3. Results and discussion

III.3.1. Oligosorbent synthesis and grafting yields

As previously mentioned, the Cd-specific sequence first described [134] has been modified by many authors [14,19,21,170,172,174,176] in order to adapt it to the immobilization procedure (addition of thiols or amino functions) or detection mode (fluorescence, electrochemistry, ...) for the development of aptasensors. Indeed, only a part of the sequence allows the recognition of the Cd(II) ion. As done by some authors, [18,174] it was chosen to delete the non-specific part identified by the first team [134] while keeping the first 6 nucleotides in the 3' part, this sequence being named AC1 in this work. A second sequence, named AC2, also described in the literature although less widely used, [169] was also selected. Two control sequences were also synthesized, respectively c1 and c2. These control sequences have the same composition as AC1 and AC2 but with a different nucleotide base order randomly established through a base shuffling tool provided by the Genscript website. While this kind of control sequences were not used in the development of the aptasensors, they allow the selectivity of the Cd(II) retention process to be assessed. This ensures that any observed retention is attributed to the conformation of the sequence rather than nonspecific interactions that could occur between Cd(II) ions and the nucleotide base and their anionic phosphate groups.

The sequences were then grafted on CNBr-activated Sepharose and the grafting yields were estimated by determining the residual amount of the non-grafted aptamers in the recovered solution of grafting and in the solutions used for washing after the immobilization step by ion pair RP-HPLC-UV analysis. The values of grafting yields are reported in Table 12. They are between 35% and 63%, similar to those obtained when grafting aptamers specific of organic molecules on CNBr-activated Sepharose [10]. Two independent syntheses were carried out for each OS, demonstrating a good repeatability of the grafting for each sequence (a maximum of 11% of difference between each synthesis for a given aptamer). Once the grafting yield is known, it is possible to determine the theoretical capacity of each OS functionalized with a Cd(II) specific aptamer by assuming that one mole of aptamer can retain one mole of cadmium ion. The theoretical capacity values for SPE cartridges containing 30 mg of grafted Sepharose

are also reported in Table 12. They are between 680 and 840 ng (i.e. between 23 and 28 ng/mg of grafted Sepharose), which is sufficient to extract trace amounts of cadmium from serum.

Table 12. Grafting yields for each OS and the corresponding theoretical capacities of the SPE cartridge containing 30 mg of grafted Sepharose. The two values correspond, for each sorbent, to two independent immobilization procedures.

Oligosorbent	Grafting yield (%)	Theoretical capacity (ng)
OS1	46 ; 57	680 ; 840
OS2	45 ; 42	810 ; 750
OSc1	63 ; 63	-
OSc2	35 ; 41	-

III.3.2. Selection of the percolation media

The first step of an SPE procedure consists in the percolation of the sample, during which retention of the target analyte is expected. It is therefore necessary to select a percolation buffer promoting the Cd(II) retention on OS1 and OS2. Although no medium promoting the retention of Cd(II) on an OS has been described in the literature, it is commonly admitted that choosing a buffer as percolation medium with a composition close to the aptamer sequence selection buffer should favor retention during the percolation step since an optimal affinity is then expected. Furthermore, it is reasonable to assume that a buffer used for Cd(II) measurement with an aptasensor should also be a buffer favorable to the Cd(II) retention on the OS functionalized with the same aptamer. However, for the two selected sequences, the nature of the measuring buffer was not clearly described and of very variable composition (buffers, salt solutions...). Therefore, several percolation media including those described in the works related to aptasensors, were studied with the objective to retain Cd(II) on OS1 and OS2. Two ions were also introduced with Cd(II) in the percolated buffer for these first experiments in order to compare the behavior of the target ion Cd(II) and some other ions, to evaluate the specificity of the retention process. Co(II) and Pb(II) were selected for their

double charge and for their easy determination in ICP-MS. Selectivity was also studied by comparing the ability of the support functionalized with the specific sequence to retain Cd(II) with that of the support functionalized with the control sequence. Once percolation was done, a washing step of the supports was carried out to eliminate the interfering ions potentially retained during percolation. Initially, the washing medium used was similar to that used during percolation. Subsequently, an optimization of the washing step was performed by changing the volumes and/or the nature of the washing medium. Then, the elution of the ions retained on the support was carried out with 1 mM EDTA selected for its ion chelating properties. After dilution of all the recovered fractions with 2% HNO₃, ions were quantified by ICP-MS.

All the tested percolation media are listed in Table 13, which presents also the results in a simplified way. The detailed ones are presented in Figures S2-S13 in supplementary data. Due to the large number of media tested and the need to assay ions all the fractions (percolation, washing and elution fractions), some extraction procedures were carried out only once. Nevertheless, this approach enabled us to obtain a trend in the behavior of the various ions as a function of the percolation media. In the first column (Cd retention), the positive sign means that Cd(II) is retained on the specific OS during the percolation. In the second column (Cd vs Pb and Co), the positive sign indicates that only cadmium is retained until elution, the ± sign indicating that cadmium but also one of the two interfering ions tested is retained until elution. The minus sign indicates that Cd(II), Co(II) and Pb(II) are retained until elution, thus indicating a poor specificity of the retention process. In the third column, the positive sign indicates that Cd(II) is retained until the elution only on the specific OS and not on its control OS thus meaning that selectivity is obtained using this percolation and washing media. For this column, the minus sign indicates that cadmium is retained until the elution on the specific OS but also on its control OS (meaning that no selectivity was observed).

Table 13. Evaluation of cadmium retention during percolation, specificity (retention of Cd(II) vs. Co(II) and Pb(II) until elution on the specific OS) and selectivity (retention of Cd(II) until elution on the specific OS vs the control OS) for all the percolation media tested. The results are presented in detail in Figures S2-S13.

*Tris-HCl (20 mM), KCl (25 mM), NaCl (50 mM), MgCl₂ (5 mM), pH 7.4. **Sodium acetate (10 mM), sodium perchlorate (10 mM), pH 6.0. PBS1: Na₂HPO₄ (10 mM), KH₂PO₄ (1.8 mM), NaCl (137 mM), KCl (2.7 mM), pH 6.6. PBS2: NaH₂PO₄ (25 mM) + Na₂HPO₄ (25 mM) + NaCl (150 mM), pH 6.6.

Percolation media	Cd retention		Cd vs Pb & Co		Cd behavior	
	OS1	OS2	OS1	OS2	OS1 vs OS _{c1}	OS2 vs OS _{c2}
ultra-pure H ₂ O	+	+	-	-	-	-
EDTA (10 ⁻⁵ M to 10 ⁻³ M)	-	-	-	-	-	-
NaCl (10 mM pH 6.0)	+	+	-	-	-	-
MgCl ₂ (5 mM pH 6.0)	-	+	-	±	-	+
NaNO ₃ (10 mM pH 6.0)	+	+	±	-	-	-
Na ₂ HPO ₄ (100 mM pH 7.0)	-	+	-	±	-	+
HEPES (30 mM pH 6.5)	+	+	-	-	-	-
MES (50 mM pH 6.0)	+	+	-	-	-	-
Tris-HCl + KCl + NaCl + MgCl ₂ *	-	+	-	±	-	+
Acetate + perchlorate**	+	+	-	+	-	+
PBS1	-	+	-	±	-	+
PBS2	-	+	-	+	-	+

When percolating spiked ultra-pure water (Figure S2), both specific OSs (OS1 and OS2) retained cadmium during percolation, however neither selectivity or specificity were observed, but EDTA 1 mM induced the ion elution. Using increasing amount of EDTA from the percolation to washing and next elution solutions (Figure S3) to potentially observe a difference in the behavior of Cd(II) vs. Pb(II) and Co(II) (by expecting that the interfering ions would elute with a lower EDTA concentration), none of the ions were retained on the OSs, even at a very low EDTA concentration (10⁻⁵ M). As it is well known that some ions favor the

conformation change of aptamers, different solutions containing NaCl (Figure S4), MgCl₂ (Figure S5), NaNO₃ (Figure S6) or Na₂HPO₄ (Figure 25A and S7) were then evaluated as percolation media. None of its salts allowed to obtain a selective and specific retention of cadmium on OS1. In return, some selectivity and specificity for Cd(II) vs. Co(II) was observed on OS2 using MgCl₂ and Na₂HPO₄, even if Pb(II) was retained as was Cd(II). Then, buffers such as HEPES (Figure S8) or MES (Figure S9) were investigated as they were reported as measurement media of some aptasensors developed for Cd(II). In these buffers, only Co(II) appears to be partially lost in the washing fraction but neither specificity of Cd(II) vs. Pb(II) or selectivity were observed on the OSs. A Tris buffer (Figure S10) containing salts was also tested on the OSs, as it was used as measuring medium of aptasensors. In this medium, only OS2 led to the retention of Cd(II) until elution and selectivity and specificity towards Co(II) were observed. However, the lack of specificity towards Pb(II) persisted. Based on literature, an acetate + perchlorate medium was next tested (Figure S11). Cd(II) was retained on OS1 during percolation but not until elution. On OS2, for the first time, a specific and selective retention was observed. Finally, the use of PBS (phosphate buffered saline) was envisaged as it was also reported in literature, even if its composition has not been precisely detailed. Two PBS buffers of two different compositions and ionic strengths were then tested (Figure 25B, S12 and S13). On OS1 none of the two PBS buffers allowed the retention of Cd(II) during the percolation step. On OS2 when percolating PBS1 containing Na⁺ and K⁺ cations (Figure S12), Cd(II) was retained along with Pb(II) until elution whereas with the PBS2 containing only Na⁺ as cation, only Cd(II) was retained until elution, leading to both selectivity and specificity (Figure S13). This illustrates that ions present in the percolation and washing solutions strongly impact the OS behavior, affecting the conformation of the aptamer and competing with target ions to potentially interact with the aptamer.

To conclude with OS1, none of the tested media allowed to obtain the expected SPE performances in terms of specificity and selectivity. As illustrated by Figure 24, which presents the best SPE profile obtained with OS1, some specificity was observed as Co(II) was only very weakly retained by OS1, but selectivity was low, since Cd(II) retention was the same on OS1 and OS1c. Therefore, this sorbent has not been characterized further in the following.

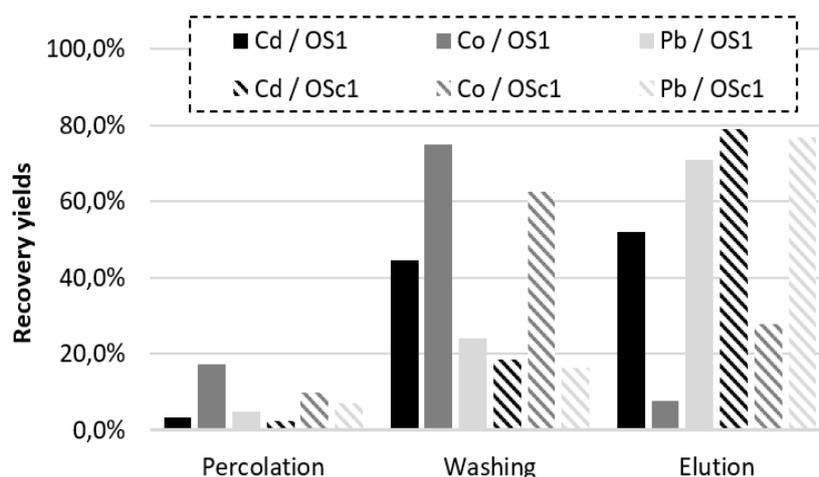


Figure 24. Extraction profiles of Cd(II), Co(II) and Pb(II) ions in optimized media for OS1 and its control. Extraction procedure: P: 1 mL of 30 mM MES + 10 mM NaNO₃ spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II) each; W: 4 mL of 10 mM NaNO₃; E: 2 mL of 1 mM EDTA.

With OS2, only two of the media tested (NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄ + NaCl (PBS2) or CH₃COONa + NaClO₄) generated specificity since the recovery of Pb(II) in the elution fraction is less than 20%. However, when using perchlorate + acetate, specificity was only observed during the washing steps, whereas when using PBS2, the interfering ions were mostly eliminated during the percolation step. Furthermore, as the objective was to selectively extract Cd(II) from serum samples, the percolation medium chosen for further study was the one that most closely resembles the composition of serum, i.e. a phosphate buffer. This is why PBS2 was selected.

Then, the extraction procedure was optimized by varying the volume of the washing and elution fractions. The resulting extraction profiles of Cd(II) and interfering ions on OS2 and its control are reported on Figure 25B. An extraction yield of 85% ± 2.6% (n=3) was obtained for Cd(II) in the elution fraction of OS2, whereas it was only 1% ± 0.3% with the control, demonstrating that the retention on OS2 was due to interactions with the specific AC2 aptamer. Regarding Co(II) and Pb(II), they were mostly removed from OS2 and its control during the percolation of the sample.

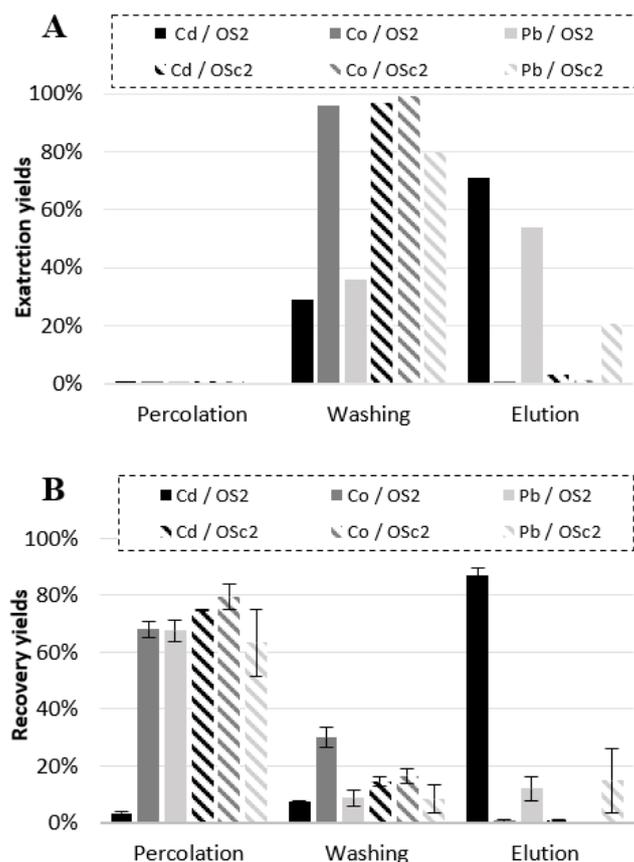


Figure 25. Extraction profiles of Cd(II), Co(II) and Pb(II) ions percolated on OS2 and its control in (A) Na₂HPO₄ 100 mM or (B) PBS2 after optimization of the whole extraction procedure (n=3). SPE procedure: (A): Percolation: 1 mL of Na₂HPO₄ 100 mM spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 2 mL of the percolation solution; Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0; (B): Percolation: 1 mL of Na₂HPO₄ 25 mM + NaH₂PO₄ 25 mM + NaCl 150 mM (PBS2) spiked with 30 ng of Cd(II), Co (II) and Pb(II); Washing: 1 mL of PBS2; Elution: 500 μL of EDTA 1 mM.

III.3.3. Simulation of aptamer conformations

In order to try to understand the impact of the cation nature on the aptamer conformation, and thus the consequent OS2 behavior, the AC2 sequence was modelled. Unfortunately, in the software typically used, only the concentrations of Mg²⁺ and Na⁺ can be fixed whereas the presence of other ions cannot be simulated. However, a simulation was done with a Na⁺ concentration of 225 mM (corresponding to the sodium concentration in the optimal percolation medium PBS2) and compared to the one achieved with 10 mM Na⁺, a

concentration which did not allow to obtain selectivity or specificity on the OS2 support (as shown in Figure S4). No difference in the secondary structure of AC2 was observed between the two tested sodium concentrations (the modelization obtained for the two Na⁺ concentration is shown in Figure S14). A further comparison between 225 Na⁺ and 5 mM Mg²⁺, a medium which provides selectivity and specificity for Co(II) but not for Pb(II), was carried out and the same secondary structure was obtained. It seems therefore that, although it could be of great help in limiting the number of conditions to be evaluated in this type of study, this type of modelling is still not sufficient to understand the mechanisms involved in the retention of cadmium on the OS2 support grafted with the AC2 sequence.

III.3.4. Experimental capacity of the oligosorbent

Once the optimal extraction conditions fixed, the capacity of OS2 was determined. It corresponds to the maximum amount of analyte that can be retained on a given amount of OS by specific interactions. In order to measure it, the optimized procedure described in Figure 25B was applied using PBS2 as percolation medium spiked with increasing amounts of Cd(II) (from 30 to 300 ng). The amounts of Cd(II) retained on OS2 and its control, corresponding to the amount found in the elution fractions, are reported in Figure 26. For OS2, the curve is composed of two parts. In the first part, the quantity retained increases proportionally to the quantity percolated, corresponding to a constant extraction yield. It is in Figure 25B (85% ± 2.6%, n=3)). The curve then reaches a plateau indicating the saturation of OS2 by Cd(II) ions. For OS2c, regardless the Cd(II) amount introduced, the slope of the curve remains constant and close to zero, illustrating once again the selectivity of the SPE procedure previously optimized where no non-specific interactions occur with the optimized SPE protocol. According to Figure 26, the OS2 capacity (which corresponds to the break in the slope) is about 180 ng of Cd(II) per 30 mg of sorbent (i.e. a capacity of 6 µg/g). This experimental capacity is about four times smaller than the calculated theoretical value (cf. Table 12, 2nd synthesis). One hypothesis for this difference is steric hindrance between grafted aptamers, which prevents them from assuming a conformation suitable for Cd(II) trapping. However, even if the experimental capacity value seems low, it is perfectly adapted to the percolation of

samples contaminated at the trace level such as blood, since the threshold value of Cd(II) in this fluid is 4 µg/L.

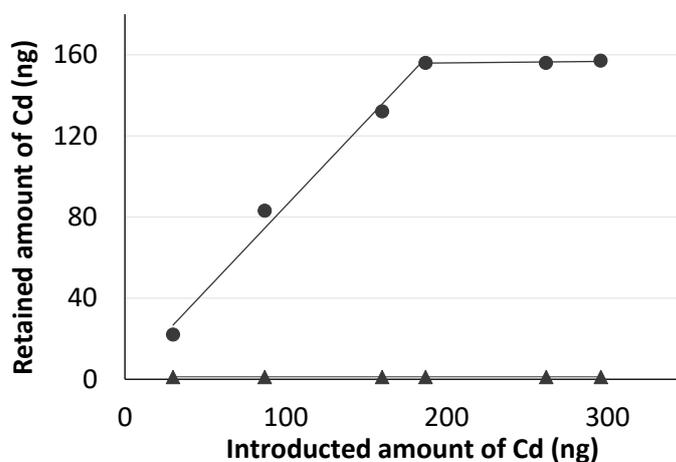


Figure 26. Capacity curves obtained for Cd(II) after the percolation of an increasing amount of Cd(II) on OS2 (circle) and OSc2 (triangle). The retained amount of Cd(II) corresponds to the amount found in the elution fraction after applying the optimized extraction procedure described in Figure 25B.

III.3.5. Specificity of the oligosorbent

In order to carry out a more detailed study of the specificity of OS2, a mixture containing the ions Mg(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II) and Pb(II) was percolated on OS2 and OSc2, the sum of their percolated amount being lower than the capacity. The results are reported in Figure 27. Except for Cu(II), all interfering ions were not retained on OS2 since they are mostly eliminated during the percolation step and their extraction yields in the elution fraction are below 20%. Regarding Cu(II), it is retained on OS2 until elution. However, a similar behavior is observed on the control, which means that it is retained by non-specific interactions on OS2 unlike Cd(II) which is retained in a specific way on OS2 (because not retained on OSc2). It can also be noticed that some authors that had used the AC2 sequence for the development of Cd-aptasensors also mentioned the existence of interference with Cu(II) [169,179] (Table S3). However, in return to aptasensors, the use of ICP-MS to analyze the extract after the oligoextraction step allows to distinguish Cu from Cd thus removing the risk of false positive

in Cd determination. Moreover, if necessary, the total removal of Cu(II) from the extract can be achieved by percolating the sample first on OSc2 which allowed Cu(II) to be trapped without trapping Cd(II) which can be then selectively retained on OS2. Nevertheless, to complete this study related to the selective potential of the OS, it was further applied to serum samples.

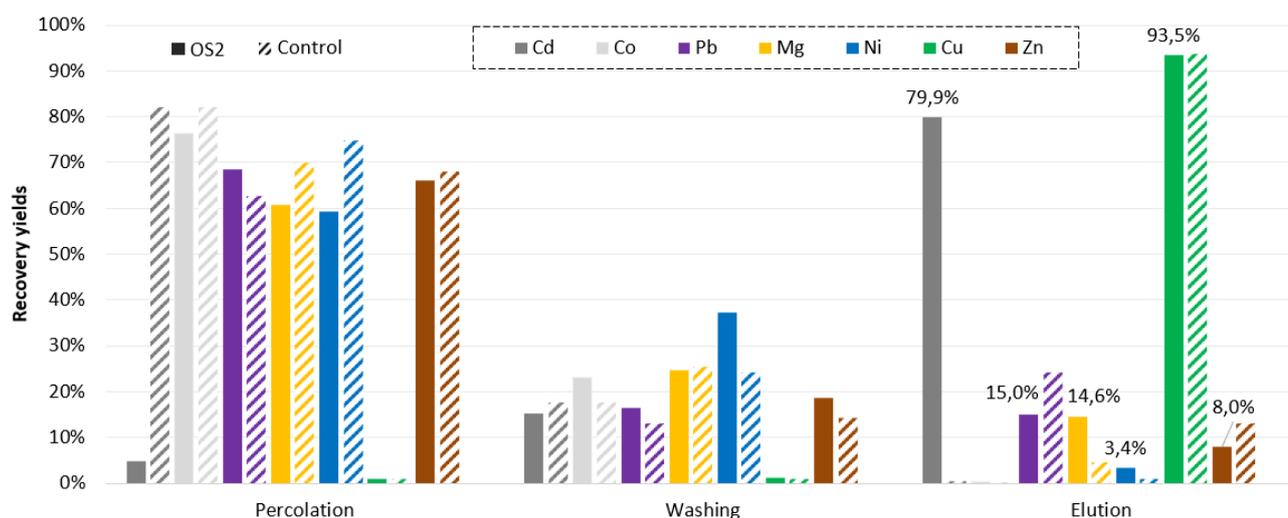


Figure 27. Extraction profiles of Cd(II) and interfering ions (Co(II), Pb(II), Mg(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II)) on OS2 (full histograms) and OSc2 (hatched histograms). SPE procedure: percolation: 1 mL of Na₂HPO₄ 25 mM + NaH₂PO₄ 25 mM + NaCl 150 mM spiked with 15 ng of Cd(II), Co(II), Pb(II), Mg(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II); Washing: 1 mL of the percolation buffer; Elution: 500 µL of EDTA 1 mM.

III.3.6. Oligoextraction of Cd(II) from serum samples

Once the performance of OS2 evaluated with spiked buffers, the extraction procedure was applied to real serum samples. An acid digestion step was performed before oligoextraction to remove proteins that could complex Cd(II) and plug the SPE cartridge [218,219]. The digested serum was further centrifuged and the supernatant was either diluted with the phosphate buffer PBS2, to be passed through OS2 before the ICP-MS analysis of the elution fraction, or diluted with HNO₃ 2% and directly analyzed by ICP-MS. This procedure was applied on a human serum not spiked or spiked at levels ranging from 2 to 30 µg/L (n=2 for each

concentration level). Results are reported in Figure 28. The calculated concentrations were plotted as a function of the spiking levels. The concentration in the raw serum is then determined by extrapolating the line to $y = 0$. Hyperbolas of 95% confidence are plotted to determine the uncertainty on either side of the raw serum value. The Cd(II) concentration in raw serum is 1.83 $\mu\text{g/L}$ and is between 1.02 and 2.69 $\mu\text{g/L}$ with a 95% confidence interval. The slope of the curve allows the determination of the extraction yield and a value of 75% with a standard deviation of 1.6% ($n=6$) was obtained. This extraction yield is slightly lower than the one obtained previously with the phosphate buffer and the difference can be explained by some Cd(II) loss during the acid digestion step and the associated centrifugation steps. To confirm this hypothesis, the serum extract was spiked with Cd(II) at 30 $\mu\text{g/L}$ after performing these steps. In this case, a Cd(II) extraction yield of 81% was obtained, confirming a partial loss of Cd(II) during the serum pretreatment. By analyzing Cd(II) in the diluted supernatant (without an oligoextraction step) by ICP-MS, the recovery was estimated at 57% revealing a matrix effect in comparison with the results obtained with the oligoextraction step (75%).

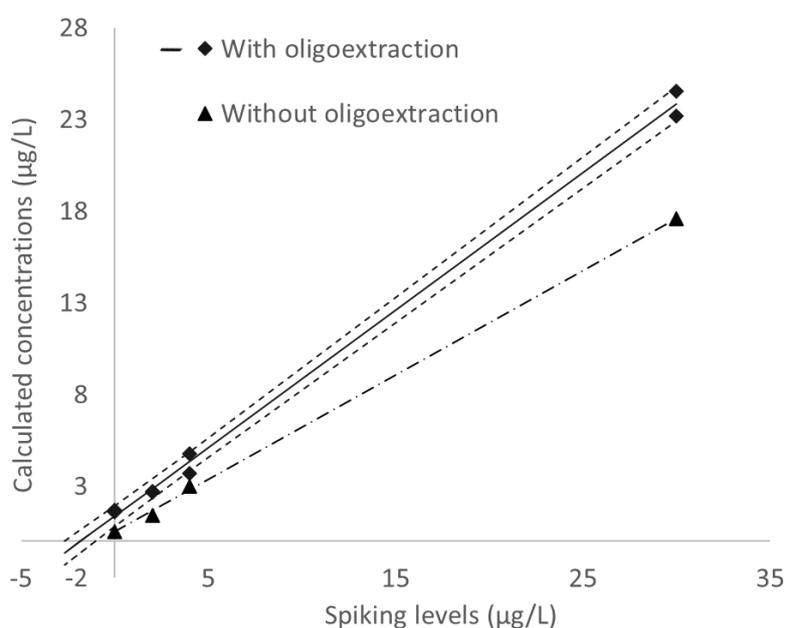


Figure 28. Calibration curves for the analysis of Cd(II) in a human serum submitted to an acid digestion step and with (solid lines and square markers) or without (dotted lines and triangle markers) oligoextraction. Spiking levels are between 0 to 30 $\mu\text{g/L}$. The 95% confidence hyperbolas for the results with oligoextraction are shown as dotted lines

In order to pre-validate the whole method, the protocol was applied to a certified serum (certified concentration value in Cd(II) of $8 \pm 1.2 \mu\text{g/L}$). The concentration level determined in the certified serum sample after applying a purification step on OS2 was $8.84 \pm 0.21 \mu\text{g/L}$ ($n=3$), which corresponds to the expected value. In return, a value of $5.24 \mu\text{g/L}$ was obtained when determining Cd(II) after the acid digestion but without the oligoextraction step, which is far from the certified value (a difference of more than 30%). This confirms the presence of matrix effects in ICP-MS when analyzing the digested extract of serum after a dilution but without an oligoextraction step, thus preventing a reliable quantification of Cd(II). All these results confirm the high potential of oligoextraction as an extraction method of cadmium from a complex biological sample, allowing its reliable quantification by reducing the matrix effects in ICP-MS.

It is also important to notice that, over 40 extraction procedures in pure medium over a period of 18 months were carried out and no loss of retention was observed. The reusability of the support in real samples was also investigated and no loss of retention was observed after more than 20 oligoextraction procedures applied to plasma samples, demonstrating the excellent stability of the sorbent.

III.3.7. Conclusions

The objective of this study was to develop for the first time a selective and specific extraction sorbent based on aptamers to extract Cd(II) from a serum sample. After identifying two promising sequences in literature, they were grafted on CNBr-activated Sepharose. If these two sequences had previously led to good results when used in aptasensors, this study revealed, by studying in parallel other interfering cations but also the retention of ions on a control support prepared from a scrambled aptamer, that the achievement of selectivity and specificity results from the careful optimization of the extraction procedure. In this respect, the nature of the percolation medium appears to be a key factor in promoting affinity between the aptamer and the target ion and therefore retention. This study finally showed that once the procedure was optimized, its application to a real sample led to performances similar to those obtained in pure medium (75 % vs 85 % in pure media) and guaranteed an equally

reliable analysis of cadmium in pure medium by suppressing matrix effects. Even if aptamers are highly sensitive to the percolation medium, it seems that a dilution of serum in percolation buffer is sufficient to ensure not only cadmium retention but also the specificity and selectivity observed in pure medium. On a fundamental level, other studies could then be carried out, in particular by more detailed modelling taking into account the presence of all the ions present in the media in order to better understand the mechanisms involved in the retention process. On a more applicative level, although rarely reported in literature, the use of control sequences is essential to demonstrate the selectivity of the retention process. In the future, miniaturization of the OS could also be considered in order to couple it on line with the ICP-MS, which would limit the handling steps by an operator. Another future prospect is the use of less specific but less costly instruments than ICP-MS, such as ICP optical emission spectrometry or graphite furnace atomic absorption spectrometry, which further justifies the use of highly specific support such as OS2.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Appendix

Supplementary data

Author Contributions

Conceptualization: V. Pichon, N. Delaunay. Formal analysis and investigation: F. Gignac. Writing-original draft preparation: F. Gignac. Writing-review and editing: V. Pichon, N. Delaunay. Funding acquisition: V. Pichon. The manuscript was written through contributions of all authors.

Conclusion du chapitre

Au cours de ce chapitre un support à base d'aptamères pour l'extraction du cadmium a été développé. Pour cela, des séquences ayant la capacité de reconnaître le cadmium ont été identifiées dans la bibliographie. Cependant ces dernières n'ont été utilisées que pour le développement de supports, ce qui ne nécessite pas la rétention mais la reconnaissance de la cible. De plus, un certain nombre d'informations semblaient manquantes dans les articles étudiés telles que la régénération des capteurs, ou encore la description précise des milieux de mesure utilisés. Aucune étude de sélectivité n'a été réalisée. La spécificité a pu être étudiée par les auteurs, sans pour autant expliquer si cette dernière était apportée par l'aptamère ou par la méthode de détection utilisée. Des séquences contrôles appelées « scramble » ont aussi été sélectionnées par nos soins afin d'étudier la sélectivité des futurs supports. Une fois le greffage et les premiers essais d'extraction réalisés, il a été constaté que la séquence AC1 (support OS1), bien que très utilisée pour le développement de capteurs, ne nous a pas permis d'atteindre les performances analytiques souhaitées. En effet, cette séquence a la capacité de retenir le cadmium mais ne permet pas d'éliminer les autres ions présents dans le milieu. De plus, aucune différence de comportement n'a clairement été identifiée entre cette séquence et son contrôle. Cependant AC2 (support OS), en présence de PBS de composition précise dans le milieu, permet d'obtenir la sélectivité mais aussi la spécificité attendue. Une fois la capacité déterminée, le support a été appliqué avec succès à des échantillons de sérum, dont l'un est certifié. L'une des observations majeures de cette première étude est l'influence de la nature du milieu de percolation sur les performances analytiques constatées. Il est aussi à noter qu'une étude préliminaire sur la contamination en cadmium a été réalisée dans l'ensemble des milieux percolés sur les supports ainsi que dans les tubes / flacons utilisés pour la collecte des fractions. En effet, les concentrations attendues pour l'ensemble de l'étude étant inférieures à la centaine de $\mu\text{g/L}$, des contaminations par l'environnement et le matériel de travail ont été constatées.

Afin de pouvoir démontrer la forte affinité de la séquence OS2, une collaboration avec le Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM) de l'université Grenoble Alpes a été réalisée. L'objectif était d'appliquer une méthode développée dans le cadre de la thèse de

Blandine Billet afin de calculer des constantes de dissociation (K_d) de chacune des séquences pour Cd(II) mais aussi pour ces Pb(II) et Co(II) [220]. Le principe de la mesure est basé sur le changement d'anisotropie de fluorescence lorsqu'un aptamère, greffé avec un groupement fluorescéine, interagit avec un ion métallique. En effet lors d'interactions entre l'aptamère et les ions métalliques, le changement de densité de charge ainsi que de structure influe sur les contributions locales d'anisotropie. Les réponses obtenues pour le cadmium vont alors être comparées à celles obtenues avec les ions plomb. Le cobalt ne peut ici pas être utilisé car il entraîne un phénomène important de quenching de fluorescence. L'ensemble des mesures ont été réalisées dans le milieu optimisé, c'est-à-dire NaH_2PO_4 (25 mM) + Na_2HPO_4 (25 mM) + NaCl (150 mM), pH 6,6. Cependant, dans ce milieu aucune variation du signal de fluorescence n'a été constatée. Il est alors possible que l'utilisation de ce type de tampon ayant une forte force ionique ne soit pas adapté à ce type de mesure du K_d .

Chapitre IV

Développement de supports fonctionnalisés par des aptamères pour l'extraction du plomb d'échantillons de sérum

Chapitre IV - Développement de supports fonctionnalisés par des aptamères pour l'extraction du plomb d'échantillons de sérum

A l'issu du chapitre précédent, un support spécifique et sélectif des ions cadmium a été développé. Certains paramètres clés ont alors été identifiés, comme le choix du milieu de percolation sur les performances analytiques observées. L'importance de ce paramètre n'avait pas été soulevé lors de la lecture de la bibliographie, puisqu'un grand nombre de milieux différents ont été utilisés sans réelle justification pour le développement de capteurs. De plus, cette étude a démontré l'importance du choix d'une séquence contrôle afin d'étudier la sélectivité. Enfin, après avoir déterminé les performances analytiques du support comme la spécificité ou la capacité, l'extraction du cadmium dans des échantillons de sérum a été réalisée avec succès.

Les connaissances acquises lors du développement du support spécifique au cadmium ont été appliquées au développement du support spécifique au Plomb. Pour cela, il est nécessaire de sélectionner dans la bibliographie, décrite dans le chapitre 2, des séquences d'intérêts présentant une affinité spécifique pour le plomb. Comme observé dans ce chapitre bibliographique, certaines séquences ont aussi été utilisées pour le développement de supports de dSPE. Cependant, à l'issu de la lecture de ces articles, des questions restent en suspens, comme la sélectivité des supports, car aucun support contrôle n'a été utilisé, ou encore la spécificité puisque l'ajout d'ions interférents dans l'échantillon a simplement permis de vérifier que ces derniers ne rentraient pas en compétition lors de la mesure des teneurs en plomb, sans pour autant avoir d'informations sur leurs interactions potentielles avec le support. Bien qu'un manque évident d'informations sur la spécificité et sur la sélectivité des supports soit à noter, les séquences décrites en dSPE, aussi décrite pour le développement de certains capteurs ont été sélectionnées puisque ces derniers sont les plus utilisés dans l'ensemble de la bibliographie. Il est à noter que les séquences constituées de bases permettant la formation de la structure G-quadruplex et donc la rétention du plomb sont celles parmi les plus reportées dans la bibliographie (séquences 1 à 7 du tableau 10). Il

paraissait donc évident de sélectionner la séquence 2 et la séquence 6 du tableau 10 afin de commencer le développement de nouveaux supports d'extraction à bases d'aptamères et de comparer les performances analytiques des deux supports ainsi développés comme fait préalablement dans le cadre de l'étude des oligoadsorbants spécifiques des ions cadmium.

Ce chapitre se présente sous la forme d'un article rédigé en anglais : « Development of an oligonucleotide-based sorbent for the selective and specific extraction of Lead from biological samples » Fanny Gignac, Nathalie Delaunay, Valérie Pichon

Article 2 - Development of an oligonucleotide-based sorbent for the selective and specific extraction of lead from biological samples

Fanny Gignac ^a, Nathalie Delaunay ^a, Valérie Pichon ^{a,b,*}

^a Department of Analytical, Bioanalytical Sciences, and Miniaturization, UMR 8231 Chemistry, Biology and Innovation, ESPCI Paris, PSL University, CNRS, 10 rue Vauquelin, Paris 75005, France

^b Sorbonne Université, Paris 75005, France

Abstract

An oligonucleotide-based sorbent was developed for the selective and specific extraction of lead ions from serum samples. For this, two oligonucleotide sequences already described in literature as specific to lead ions were grafted onto CNBr-activated Sepharose to get oligosorbents adapted to solid phase extraction. Two control sequences were also grafted to study the selectivity of the developed sorbents. After measuring grafting rates of around 50-70%, experiments focused on optimizing the percolation and washing media to promote selective retention of lead ions until the elution on the sorbents grafted with the specific aptamers. A study of the kinetic of elution was also carried out in order to limit the volume of elution fractions. High selectivity was achieved under optimal conditions, with average extraction recoveries of $83 \pm 2.7 \%$ ($n=3$) and $79 \pm 8 \%$ ($n=3$) on the two specific oligosorbents against 7 and 10 % on the control sorbents. High specificity was also achieved, as extraction recoveries for most of other tested cations were below 15 %. The capacity of the most promising oligosorbent was estimated at close to 900 ng for 30 mg of support i.e. $30 \mu\text{g/g}$, which is perfectly suited to the extraction of trace amount of Pb(II) from serum. The application of oligoextraction to this complex biological sample was achieved by submitting serum sample first to an acid digestion before the oligoextraction procedure. The initial concentration of Pb(II) in serum was estimated to $87 \mu\text{g/L}$ by ICP-MS analysis using standard addition method and an extraction yield of $72 \pm 3.2 \%$ ($n=9$) was measured. A comparison with a digested serum extract submitted to a simple dilution before ICP-MS analysis was carried

out, confirming the expected reduction in matrix effects when the oligoextraction was performed and, above all, the limitation of instrument clogging.

Keywords: Solid-phase extraction; Aptamers; Oligoextraction; Lead; ICP-MS

* Corresponding author: e-mail address: valerie.pichon@espci.fr (V. Pichon)

IV.1. Introduction

Contamination by heavy metals, and lead in particular, is receiving increasing attention as it is not without consequences for human health. There are many sources of lead exposures, from paints and batteries to water pipes. Lead poisoning is known to cause irreversible physical and intellectual retardation in children, including language disorders, slowed growth, motor difficulties and hearing problems [31]. In order to monitor the exposure of populations and industrial workers, some countries have set lead concentrations to be found in blood, which is 300 µg/L for women and 400 µg/L for men in France [5]. For samples as complex as blood, a sample preparation step is necessary to limit matrix effects and interferences during quantification. Solid phase extraction (SPE) is the most widely used technique to purify and preconcentrate ions from blood samples [215]. Conventional resins such as chelating resins are widely used for Pb(II) extraction [216]. However, these resins lack specificity, leading to co-extraction of other cations. In order to overcome this lack of specificity, expensive instruments such as ICP-MS are used to quantify lead at concentrations of the order of a hundred micrograms per liter. Another strategy consists in improving the extraction specificity, which may prevent the use of expensive instruments for the quantification. This is why, new specific and selective sorbents are being developed, such as ion-imprinted polymers [83,84]. IIPs are synthetic polymers with cavities for selective trapping of target ions. The potential of IIPs has been largely demonstrated [8] but their synthesis remains a complex step in analytical development. This is why, some authors have turned to aptamer-based sorbents. Aptamers are single-stranded DNA or RNA (typically 20 to 110 bases) that have a specific and high affinity for given molecules or ions. They are identified by a complex process called SELEX for Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment [217]. Aptamers immobilized

on solid supports have been widely reported for the solid phase extraction, *i.e.* oligoextraction, of molecules [10,11,101], from small drugs to proteins, but little for the extraction of ions. Regarding Pb(II), specific sequences have been identified and used for the development of sensors [13,183,184,186–191,193–196,221,222]. Concerning extraction, some developments have been carried out implementing oligoextraction only in the dispersive mode [15,182,192]. Although these works demonstrated the capability of certain sequences to retain Pb(II), a certain amount of data has not been investigated. One of the missing studies in these articles is the selectivity of the developed supports, meaning the comparison of analytical performances between a specific support and a control support. It has been recently shown in a previous study by our team dealing with cadmium that this parameter is crucial for selecting a support whose retention is ensured by the sequences and not by non-specific interactions [223]. Furthermore, a study of competition between lead and other ions was done by the authors to determine whether the presence of other ions had an impact on the lead determination, but the study of the retention of these ions on the support, *i.e.* of the specificity of the support, was not carried out. However, specificity and selectivity are particularly important parameters if we wish to use these supports in the future with methods that are less specific but also less costly than ICP-MS. Regarding the sequences described in literature, a large portion of them contain the guanine repeat motif that enables folding into a G-quadruplex structure. Indeed, this structure is well-known for strongly interacting with lead ions, with the latter positioning itself at the center of the structure to stabilize it [181]. However, several sequences enabling this folding have been identified, without the performance of each of them being compared.

The objective of this work was to investigate the potential of aptamers to extract lead ions from complex samples, while ensuring the contribution of aptamers to the extraction process, in terms of specificity and selectivity, by studying in parallel the behavior of lead and of other cations on control sorbents. Two sequences among those reported in literature were therefore chosen to be grafted onto CNBr-activated Sepharose and packed in a cartridge. In addition to these oligosorbents (OSs), control sorbents were also prepared by grafting non lead-specific oligonucleotides on CNBr-activated Sepharose in order to study the selectivity of the supports, *i.e.* the ability of the specific sequence to retain the target and not the control ones. After measuring the grafting yields of oligonucleotides onto CNBr-activated Sepharose,

the performances of the two lead specific OSs were evaluated and compared in terms of affinity, selectivity and specificity toward other cations. Once the extraction protocol optimized, the capacity of the supports was determined and a more detailed study of specificity towards other cations was carried out. Finally, the optimized extraction protocol was applied to serum samples prior to ICP-MS analysis, and compared with simply diluted samples before ICP-MS analysis.

IV.2. Experimental

III.2.1. Reagents and samples

Metal standards (in 2% nitric acid), Trizma hydrochloride (Tris-HCl), ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt (EDTA), sodium phosphate dibasic, sodium dihydrogen phosphate dihydrate, sodium acetate, sodium chloride, magnesium chloride, Trizma buffer, 65% nitric acid, triethylamine (TEA), glacial acetic acid, human serum, and CNBr-activated Sepharose (4B, 90 μm) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Acetonitrile (ACN) was obtained from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). Hydrochloric acid 32% was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). High-purity water was obtained using a Milli-Q purification system (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). The ICP-MS was daily tuned using an Agilent tuning solution (Ce, Co, Li, Mg, Tl, and Y at 1 $\mu\text{g/L}$ in 2% HNO_3 (Les Ulis, France)). 5'-amino-modified with C_6 spacer arm DNA oligonucleotides (sequences 5'-GGGTGGGTGGGTGGGT-3' (named AP1), 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' (named AP2), 5'-TTTTTTTTTTTTTT-3' for control 1 (named C1), and 5'-GTGTGTGTGTGTGTG-3' for control 2 (named C2)) were synthesized and purified by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) from Eurogentec (Angers, France).

IV.2.2. ICP-MS

The determination of ion concentrations in solutions was performed with an ICP-MS 7850 from Agilent Technologies (Les Ulis, France) equipped with a glass MicroMist nebulizer and a

quartz Scott spray chamber with an ASX-500 autosampler. The parameters applied during the measurement were as follows: RF power, 1550 W; sampling depth, 8 mm; plasma gas flow rate, 15 L/min; auxiliary gas flow rate, 0.9 L/min; Helium flow rate, 4.3 mL/min. During the daily performance check, the monitoring of ^7Li , ^{89}Y , ^{205}Tl , CeO/Ce ratio and Ce^{2+}/Ce ratio was carried out in order to ensure constant performances on all measurements. The limit set for ratios was $\text{CeO}/\text{Ce} \leq 1.2\%$ and $\text{Ce}^{2+}/\text{Ce} \leq 2\%$. The measurements were carried out with five replicates with 100 sweeps per replicate with an integration time of 1 s. The isotopes measured for the tested ions is: ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{111}Cd , ^{206}Pb , ^{207}Pb , and ^{208}Pb . All the samples were diluted to 1/10 in 2% HNO_3 before ICP-MS measurement. To quantify ions in the different solutions, calibration curves were daily studied between 50 ng/L and 10000 $\mu\text{g}/\text{L}$. The limit of quantification (LOQ) was determined by measuring 10 blank solutions (HNO_3 2%). The equation described in Equation S2 (see Supplementary data) was then applied and the calculated LOQ value for Pb(II) was 45 ng/L. The LOQ values for the interfering ions were determined using the same method and are given in Table S4 (see Supplementary data).

IV.2.3. Oligosorbent synthesis

The procedure used to immobilize aptamers on CNBr-activated Sepharose has been previously described by our group to develop OS for organic molecules [224]. Briefly, prior to immobilization, the aptamers were dissolved at 1 g/L in a buffer (200 mM Na_2HPO_4 and 5 mM MgCl_2 , pH 8) and denatured by heating at 75°C for 5 min. The solution was then left at room temperature for 30 min. CNBr-activated Sepharose (30 mg) was swollen and washed 6 times with 1 mM HCl and then rinsed with 1 mL of ultrapure water. The aptamer solution (150 μL) was then mixed with the Sepharose gel overnight at room temperature. The oligosorbent was then placed in a 1 mL SPE cartridge between two frits and washed 3 times with 1 mL of 200 mM Na_2HPO_4 pH 8. These washing solutions were recovered and diluted in 200 mM Na_2HPO_4 and 5 mM MgCl_2 in order to measure their content in non-grafted aptamers and then to calculate the grafting yield for each support. A 0.1 M Trizma solution was percolated through the cartridge during 2 h to block the remaining active groups of Sepharose. Finally, the OS was washed 3 times alternately with 2 mL of an acetate buffer (0.1 M acetate + 0.5 M NaCl, pH 4)

and 2 mL of a 0.1 M Trizma buffer + 0.5 M NaCl, pH 8. The sorbents were conditioned with 5 mL of ultrapure water. The different oligosorbents synthesized in this study are called OS1 (oligosorbent grafted with the sequence AP1), OS2 (oligosorbent grafted with the sequence AP2) and OS_{c1} and OS_{c2} for the non-specific OS grafted with the control C1 and C2 sequences, respectively.

IV.2.4. RP-HPLC-UV analysis of aptamer

Grafting yields were determined by analyzing aptamer content in the solutions recovered after the grafting procedure by a method adapted from a previous study from our group [224]. It consists of ion pair RP-HPLC coupled to UV detection using an Agilent 1200 series HPLC system equipped with an 1100 series autosampler and a 1200 series UV detector. The aptamers were monitored at 260 nm. The separation was achieved on a Kinetex core shell C18 column (150 x 3 mm i.d., 5 µm, 100 Å) from Phenomenex (Le Pecq, France) at 50°C. The column was connected to a precolumn filter (0.5 µm frit, 2.39 x 1.65 mm, Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA). The mobile phase was composed of water with 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA, prepared with TEA and acetic acid) pH 7 and acetonitrile. The gradient applied is as follows: 7% ACN for 5 min then a ramp of 15% ACN is performed in 15 min, 15% ACN is then maintained for 5 min before re-equilibrating the column to 7% ACN during 10 min. The flow rate was set at 200 µL/min and the injected volume was 20 µL. Before sample injection, a calibration range for each aptamer sequence was performed from 0.1 to 10 µg/ml in 200 mM Na₂HPO₄ and 5 mM MgCl₂, pH 8.

IV.2.5. Extraction procedure

IV.2.5.1. Pure media

Before each extraction, the OS was conditioned with 5 mL of the tested buffer. The percolation solution was the tested buffer spiked at 30 µg/L with Pb(II) and eventually other ions (each at 30 µg/L) to study the specificity. The sorbent was further washed with the same tested buffer. Finally, elution was performed with 3 x 250 µL of 1 mM EDTA. All these steps were performed

with solutions maintained at 4°C. Each SPE fraction (percolation, washing and elution) was then diluted 1/10 in 2% HNO₃ for ICP-MS analysis. After determining the optimal percolation medium (5mM MgCl₂, pH 6), the capacity of the most promising OS was determined using the same protocol described above but by percolating 1 mL containing increasing amounts of Pb(II) from 30 to 900 ng on the OS. The elution fractions were then diluted in 2% HNO₃ with a dilution factor adapted to the introduced amount of Pb(II) to be in the calibration curve range of the ICP-MS analysis.

IV.2.5.2. Serum samples

A first step of acid digestion of the serum samples was performed to eliminate proteins that may complex lead. For this, 500 µL of serum (spiked or non-spiked) were introduced in an Eppendorf tube and mixed with 30 µL of 65% HNO₃. The mixture was centrifuged (10 min, 12 000 rpm) and the supernatant was then recovered and submitted again to centrifugation (10 min, 12000 rpm). The resulting supernatant was placed in a 10 mL polypropylene tube to be diluted with 9.5 mL of MgCl₂ solution (5 mM MgCl₂, pH 6). The pH was adjusted to 6 with 2 M NaOH. The optimized oligoextraction protocol was applied on 1 mL of treated serum sample. After oligoextraction, the elution fractions were diluted 1/3 in 2% HNO₃ and analyzed by ICP-MS. The determination of lead concentrations was done thanks to a calibration curve performed before each sequence (an example is provided in Figure S15). To demonstrate the potential of oligoextraction, the serum was spiked at concentrations of 100 and 300 µg/L of Pb(II) and the content of serum sample determined after oligoextraction was compared to the Pb(II) content determined after the analysis of a serum sample only submitted to an acid digestion and a dilution step (dilution rate of 60 in order to obtain the same dilution factor as after the oligoextraction). Three replicates were performed for each spiking level.

IV.3. Results and discussion

IV.3.1. Oligosorbent synthesis and grafting yields

As previously mentioned, sequences enabling G-quadruplex folding were identified as specific to Pb(II). They were then chosen to develop selective sorbents for the trapping of this target ion. The first sequence consists of a repeating motif of 3 guanines separated by a thymine. This motif is repeated 4 times to form a sequence called AP1. The second sequence consists of a repeating motif of 2 guanines separated by one or more thymines to form the G-quadruplex motif. This sequence is called AP2. Two other sequences were also synthesized and grafted to prepared control sorbents in order to evaluate the selectivity of these sequences towards Pb(II), i.e. the retention of the target compound on the specific support and not on the control, in different percolation media. This type of control sorbent was prepared using a scrambled sequence, i.e. a sequence with the same nucleotide bases than the specific one but placed in a random order [10,147,150] However, given the repeat patterns present in AP1 and AP2, it was impossible to use scrambled sequences here, as it was impossible to mix the nucleotide bases randomly without obtaining a sequence containing two guanines next to each other. Therefore, another strategy was used to elaborate two different control sequences. The first control sequence, called C1, is a sequence of thymine bases (poly-T) to ensure that no G-quadruplex folds could be formed, and thus could retain lead. A second sequence based on alternating guanine and thymine bases, called C2, was chosen with the same idea to prevent from G-quadruplex formation but whose nucleotide composition is closer to that of specific sequences. Both control sequences were grafted onto CNBr-activated Sepharose and the resulting control sorbents are called OSc1 and OSc2, respectively.

The grafting yields were then assessed by quantifying the remaining quantity of non-grafted aptamers in the recovered grafting solution, as well as in the solutions used to wash the sorbents after the grafting step. The quantification of non-grafted aptamers was carried out using ion pair RP-HPLC-UV analysis. The grafting yield values are reported in Table 14, ranging from 53% to 71%. These values are slightly higher to those obtained for the grafting of aptamers designed for ions and molecules onto CNBr-activated Sepharose (values between 20 and 63%) [10,159,223].

Once the grafting rate determined, it was possible to calculate the theoretical capacity of each OS functionalized with a Pb(II) specific aptamer, assuming that one mole of aptamer can retain one mole of lead ion. These theoretical capacity values estimated for SPE cartridges containing

30 mg of grafted Sepharose are also reported in Table 14. They are between 3480 and 4170 ng (i.e. between 116 and 139 ng/mg of grafted Sepharose), which is sufficient to extract trace amounts of lead from real samples.

Table 14. Grafting yields measured for each synthesized OS and their corresponding theoretical capacity values estimated for SPE cartridge containing 30 mg of grafted Sepharose.

Oligosorbent	Grafting yields (%)	Theoretical capacity (ng)
OS1	71	4170
OS2	55	3480
OSc1	57	-
OSc2	53	-

IV.3.2. Selection of the extraction media

The first step of a SPE procedure is the percolation of the sample, during which a retention of the analyte is expected. Consequently, it is essential to select a percolation medium that favors the retention of Pb(II) on OS1 and OS2. It should be reasonable to assume that a buffer used to dilute Pb(II) before its determination with a sensor functionalized with the specific sequences selected for this study would also favor the retention of Pb(II) on an OS prepared with the same aptamer. However, the nature of the measuring buffer was not explicitly defined for authors working on the development of sensors recognizing ions. It is also noticed that the nature of the tampons used varies greatly from one author to another (buffers, salt solutions, etc.). Regarding now the literature related the two selected sequences that were used to carry out Pb(II) extraction in dispersive mode [15,182,192] and in aptasensor-related studies [13,183,184,186–191,193–196,221,222], several percolation media were also reported,. So, it was decided to study the retention of Pb(II) in several media such as PBS, HEPES, or MES buffers, which have been tested in the Pb(II) dispersive extraction and sensors literature. Additionally, to understand the behavior of Pb(II) in the presence of other ions in the medium, its retention was also studied in other percolation media consisting of only one

salt such as NaCl, MgCl₂ and NaNO₃. The aim of these experiments is to identify the percolation medium(s) suitable for specific or selective Pb extraction.

Table 15 shows a simplified presentation of the results obtained for all the tested mediums, which are presented in detail in Figures S16-S25 as supplementary data. Selectivity was initially assessed by comparing the retention of Pb(II) by the support functionalized with the specific sequence with the support functionalized with a poly-T sequence, OSc1. During these experiments, not only the selectivity was investigated (specific OS vs. control OS), but also the specificity (retention of Pb(II) vs. Cd(II) and Co(II)). These two other cations were introduced with Pb(II) at the same spiking level in the percolation buffer. These ions were selected because they are doubly charge like Pb(II) and are easy to quantify by ICP-MS. After the percolation step, the supports underwent a washing step with a medium similar to that used during percolation to eliminate any interfering ions that might have been slightly retained during the percolation step. Subsequent to this, the elution of retained ions from the support was performed using 1 mM EDTA, chosen for its chelating properties. The quantification of ions was achieved through ICP-MS after dilution of all collected fractions with 2% HNO₃. As regards reading Table 15, in the first column (Pb retention), a positive sign indicates retention of Pb(II) on the specific OS during percolation. For the second column (Pb vs Cd and Co), a positive sign indicates exclusive retention of lead ions until elution, a ± sign indicates retention of lead ions with one of the interfering ions tested, and a negative sign indicates retention of Pb(II), Cd(II), and Co(II) until elution, i.e. a lack of specificity in the retention process. The positive sign on the third column indicates that Pb(II) is retained until elution only on the specific OS, reflecting selectivity retention of the target ion in this percolation and washing medium. Conversely, a negative sign in this column indicates retention of lead until elution on both the specific OS and on OSc1, signifying lack of selectivity.

Table 15. Evaluation of Pb(II) retention during percolation, specificity (retention of Pb(II) vs. Cd(II) and Co(II) until elution on the specific OS) and selectivity (retention of Pb(II) until elution on the specific OS vs the control OSc1) for all the percolation media tested. The results are presented in detail in Figures S16-S25.

PBS1: Na₂HPO₄ (10 mM), KH₂PO₄ (1.8 mM), NaCl (137 mM), KCl (2.7 mM), pH 6.6. PBS2: NaH₂PO₄ (25 mM) + Na₂HPO₄ (25 mM) + NaCl (150 mM), pH 6.6.

Percolation media	Pb retention		Pb vs Cd & Co		Pb selectivity	
	OS1	OS2	OS1	OS2	OS1 vs OSc1	OS2 vs OSc1
PBS1	+	+	+	+	-	-
PBS2	-	-	-	-	-	-
HEPES (30 mM pH 6.5)	+	+	-	-	-	-
MES (50 mM pH 6.0)	+	+	-	-	-	-
Tris-HCl (20 mM), KCl (25 mM), NaCl (50 mM), MgCl ₂ (5 mM), pH 7.4	+	+	+	+	-	-
CH ₃ COONa 10mM + NaClO ₄ 10 mM, pH 6.6	+	±	-	-	+	+
NaCl (10 mM pH 6.0)	+	+	-	-	-	-
NaNO ₃ (10 mM pH 6.0)	±	±	-	-	-	-
MgCl ₂ (5 mM pH 6.0)	+	+	+	+	+	+

Due to the wide range of studied percolation media and the necessity of measuring ion content in all the recovered fractions (percolation, washing, elution), the extraction procedures corresponding to each tested medium were carried out only once. Nonetheless, this strategy enabled us to highlight the effect of the nature of the percolated medium on ion retention. A first investigation was carried out in phosphate buffer saline (PBS), a medium widely reported in the literature [184,186–190,192,194,200,202]. However, in these works, the exact composition of the PBS used was not clearly described. Consequently, two PBS buffers of two different compositions and ionic strengths were tested (Figures S16 and S17). Pb(II) retention and specificity towards other ions were observed on both specific sorbents in PBS1, but no selectivity was observed. In PBS2, no retention, specificity or selectivity was observed on OS1 and OS2. One of the main differences between these PBSs is the presence

of K^+ ions in PBS1, absent in PBS2. This suggests that K^+ promotes Pb(II) retention. Next, buffers such as HEPES (Figure S18) or MES (Figure S19) were studied as they were reported as measurement media of some aptasensors developed for Pb(II) [12,191,196]. In these buffers, although Pb(II) was retained until elution on OS1 and OS2, none of these buffers provide selective and specific retention of lead. A Tris buffer was also tested (Figure S20), as it has been used in literature on aptasensors and, more generally, this buffer is widely used as a percolation media for molecule extraction [10,13,159,183,193,195,199,201,221]. In Tris buffer, the behavior was similar to that observed in PBS1, i.e., specific retention of Pb(II) but without any selectivity. This could be explained by the fact that this medium also contains KCl, as in PBS1, and that the presence of the other ions does not seem sufficient to improve selectivity. Based on literature, a mix of sodium acetate and sodium perchlorate was also tested (Figure S21). For the first time, a difference in behaviour was observed between OS1 and OS2 in this medium: Pb(II) was only slightly retained on OS2, whereas it is retained on OS1. In addition, although the specificity with Cd(II) and Co(II) was not achieved, a selective retention of Pb(II) was obtained for the first time.

Finally, as it is well known that some ions promote conformation changes in aptamers, different solutions containing NaCl (Figure S22), $NaNO_3$ (Figure S23), and $MgCl_2$ (Figure S24) were also evaluated as percolation media. NaCl and $NaNO_3$ did not allow selective and specific retention of lead on both OSs. The only medium that provides specificity (no retention of Cd(II) and Co(II)) as well as selectivity (no retention on OSc1) is $MgCl_2$ 5mM. This study on percolation media confirms the significant influence of cations present in the percolation medium on the specific and selective retention of lead.

However, with the best media ($MgCl_2$), the total recovery yields for Pb(II) are only 60% on both specific supports, highlighting the necessity to optimize the elution step. An increase in the elution volume from 1 to 5 mL led to a complete recovery of lead. Next, an increase in the volume of the washing solution from 1 to 5 mL allowed a improvement of selectivity for both OS1 and OS2 in comparison with OSc1 (Figure S25). To complete the selectivity study after the optimization of the washing and elution volumes, these conditions were applied to the second control sorbent, OSc2, whose nucleotide bases are closer in nature to the specific supports than OSc1 (Figure S25). An extraction yield of 77 % and 75 % was obtained for Pb (II) using OS1 and OS2 respectively, whereas it was only 10 % using the two control sorbents, demonstrating

that the retention on the specific OSs was due to interactions with the G-quadruplex sequences. These results confirmed the selectivity of the specific supports and also the importance of the formation of the G-quadruplex structure for Pb(II) retention. Furthermore, this study emphasizes the importance of studying the potential of aptamers by studying in parallel a control sequence when searching for an optimal selectivity of the aptamer recognition. Indeed, with media such as PBS or Tris-HCl, specificity was achieved, but not selectivity. However, the lack of selectivity may increase the risk to retain other ions than the target ion which may affect specificity. However, this optimization also highlighted the need to use 5 mL of EDTA solution to elute all the percolated lead, which implies dilution of the final extract prior to ICP-MS analysis, thus affecting the sensitivity of the final method. To overcome this problem, further study of elution step is required.

IV.3.3. Optimization of the elution conditions

In order to reduce the volume of EDTA required to elute Pb(II) from the OSs and then to limit the dilution factor before ICP-MS measurements, tests were carried out by applying 5 x 1 mL of EDTA solution which were left in contact with the OS for 0, 7, 15 or 30 min. Indeed, it is well-known that slow kinetic may occur with ion extraction. Each elution fraction was then recovered from the support, diluted in 2% HNO₃, and the Pb(II) concentration determined by ICP-MS. These experiments were carried out with an EDTA solution maintained at 4°C or at room temperature. The cumulative lead yields obtained for OS1 and OS2 are shown in Figures 29 and S26, respectively. For both sorbents, it can be seen that the contact time has an influence on the number of fractions required to elute Pb(II). Without contact time, Pb(II) starts to elute at the 3rd mL, whereas with a contact time of 7 min for each elution fraction, it elutes from the first mL. When the contact time is increased, lead recovery in the first mL increases, which demonstrates that there is a kinetic issue with these both OSs. It is worthwhile to notice that it was not the case with our previous study dealing with OSs dedicated to cadmium [223]. One may wonder whether this is linked to the fact that with lead, the interaction site seems to be based on a G-quadruplex, which was not the case with cadmium. It has notably been observed in the literature that the G-quadruplex structure

formed in the presence of Pb(II) is particularly stable, and notably more stable than with other ions that can stabilize the G-quadruplex form, such as Na⁺ or K⁺ [225]. It is also explained that the mechanism of formation of the Pb-G-quadruplex structure is achieved through two intermediates, and the entire formation mechanism of the structure requires a relaxation time of more than 1 second.

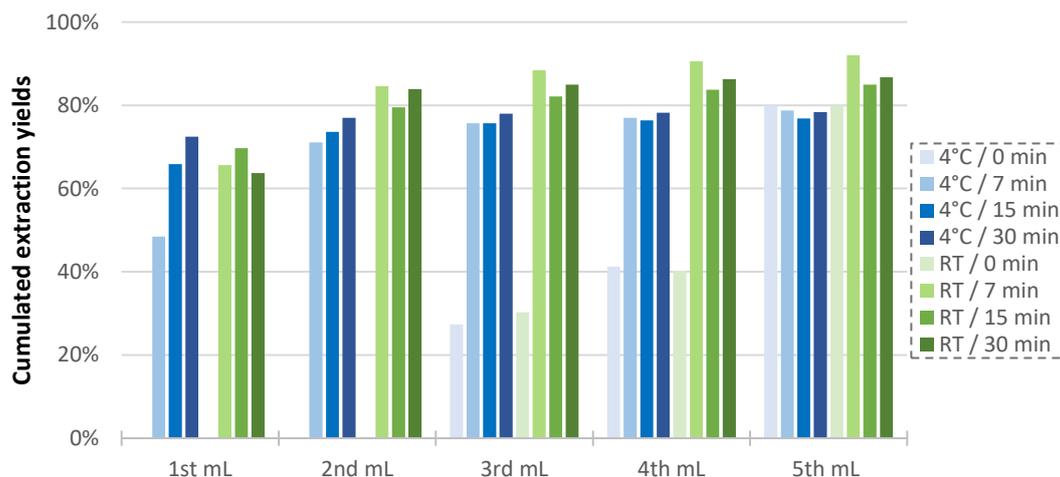


Figure 29. Extraction yields obtained in cumulated elution fractions on OS1 with a contact time of 0, 7, 15 or 30 min for each fraction of elution solution (EDTA 1 mM, pH 6.0) at 4°C (blue histograms) or at room temperature (green histograms).

A kinetic effect having been confirmed, it was logical to study the effect of temperature next. It can be observed Figure 29 that an increase in the EDTA solution temperature from 4°C to room temperature induced an increase in the elution kinetic. A compromise had to be found to limit the total extraction time. Therefore, a contact time of 7 min at room temperature was selected. The volumes required for Pb(II) elution were finally optimized at 3 x 250 µL, with a contact time of 7 min for each elution fraction. The resulting extraction profiles of Pb(II) and interfering ions on OS1, OS2 and on the controls are reported on Figure 30. An extraction yield of 83% ± 2.7% (n=3) for OS1 and 79% ± 8% (n=3) for OS2 was obtained for Pb(II) in the combined elution fractions (750 µL), whereas it was only 7% ± 5% for OSc1 and 10% ± 2% for OSc2. Similar profiles were obtained for the both specific OSs.

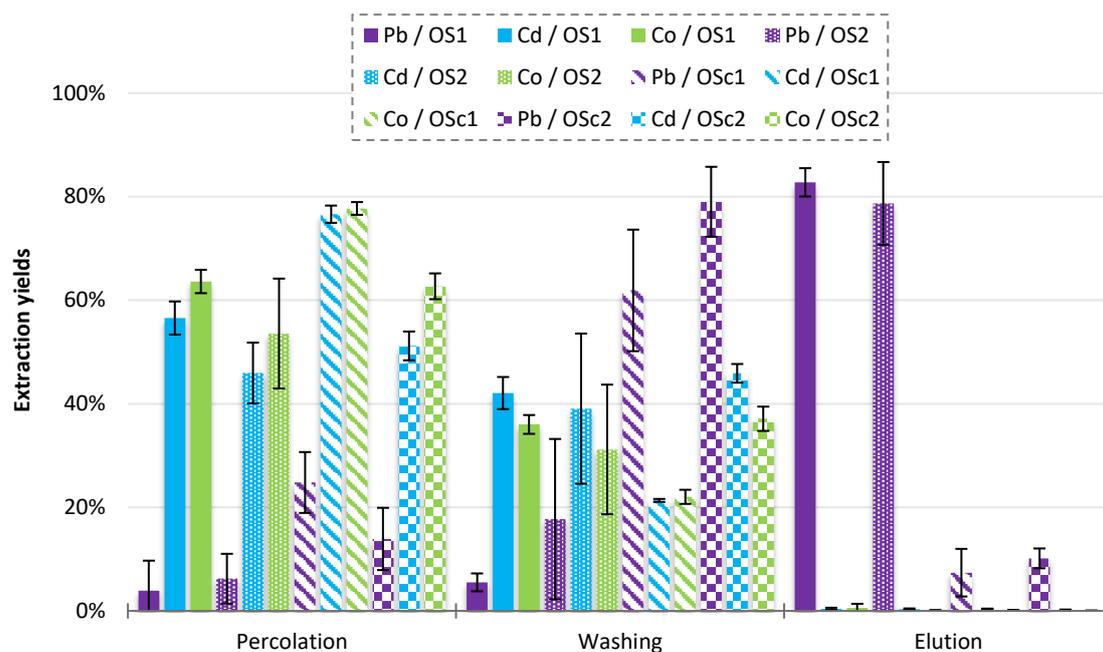


Figure 30. Extraction profiles of Pb(II), Cd(II) and Co(II) ions percolated on OS1, OS2 and the control sorbents, OSc1 and OSc2. SPE procedure: Percolation: 1 mL of MgCl₂ 5 mM spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 5 mL of the percolation solution; Elution: 3 x 250 μL of EDTA 1 mM, Contact time of 7 min at room temperature.

IV.3.4. Evaluation of the experimental capacity

Once the optimal extraction conditions fixed, the capacity of the two specific OSs was determined. It corresponds to the maximum amount of analyte that can be retained on a given amount of OS by specific interactions. To evaluate the capacity, the optimized procedure described in Figure 30 was applied to MgCl₂ solutions spiked with increasing amounts of Pb(II), from 30 to 900 ng. The amounts of Pb(II) retained on each OS and on the control sorbents, corresponding to the amount found in the combined elution fractions, are reported in Figure 31. For OS1, a yield of 84 %, obtained until 600 ng of Pb(II) percolated was similar to that measured during the optimization phases (82%). During the percolation of 900 ng of Pb(II) on the support, the extraction yield drops to 74%, indicating that the support's capacity has been reached. Therefore, the experimental capacity of OS1 ranges between 600 and 900 ng. For OS2, a yield of 70 % is observed until 250 ng percolated. For 600 and 900 ng, the extraction yields drops to 64 % and 58 % respectively. The capacity of OS2 support is between 250 ng

and 600 ng percolated. In conclusion, the capacity of OS1 is higher than that of OS2. OS1 is therefore selected for lead extraction from serum samples, as its estimated capacity aligns perfectly with the expected values in this matrix. For the OSc1 and OSc2 controls, the slopes of the superimposed curves correspond to recoveries of about 12%. These results are in good agreement with extraction recoveries lower than 20% observed in Figure 30, and resulting from low non-specific interactions.

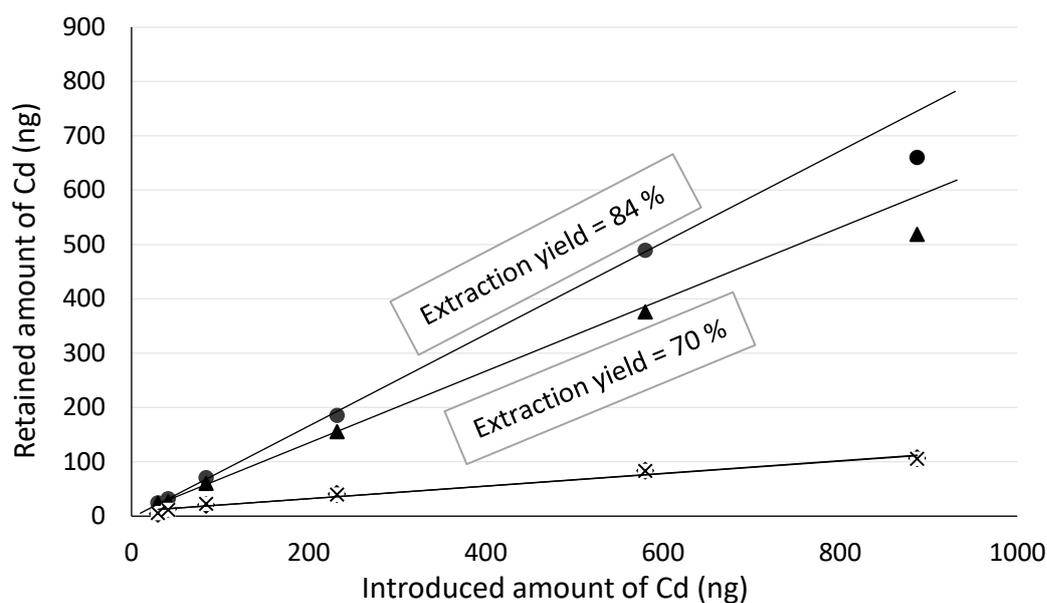


Figure 31. Capacity curves obtained after the percolation of an increasing amount of Pb(II) on OS1 (circle), OS2 (triangle), OSc1 (Cross) and OSc2 (diamond). The retained amount of Pb(II) corresponds to the amount found in the combined elution fractions after applying the optimized procedure (see caption of Figure 30). The curves correspond to the constant yield obtained during extraction when the capacity has not been exceeded.

IV.3.5. Specificity of the oligosorbents

To conduct a more comprehensive investigation of the specificity of the OSs, a solution of MgCl₂ spiked with Pb(II), Co(II), Cd(II) but also Ni(II), Cu(II), and Zn(II) was percolated through the specific OSs and the control supports. The prior determination of capacity was necessary to ensure that all percolated ions could potentially be retained without competition due to

the support's capacity limit. The results are reported in Figure 32. With the exception of Cu(II) and Pb(II), all other ions did not bind to OS1 and OS2 as they were largely removed during the percolation process. The extraction yields for these ions in the elution fraction were found to be below 30%. Concerning Cu(II), it remained retained by both supports until elution. However, a comparable behaviour was observed with the control sorbents, suggesting that its retention on OS1 and OS2 is due to non-specific interactions. This is in contrast to Pb(II), which displays a selective retention on OS1 and OS2 as evidenced by its lack of retention on the control sorbents. In addition, if a total removal of Cu(II) from the extract is required, this could be achieved by percolating the sample first on CNBr-activated Sepharose, which allow the trapping of Cu(II) but not of Pb(II), which could then be selectively retained on the specific OSs. This may be very useful if less specific instruments than ICP-MS are used for quantification.

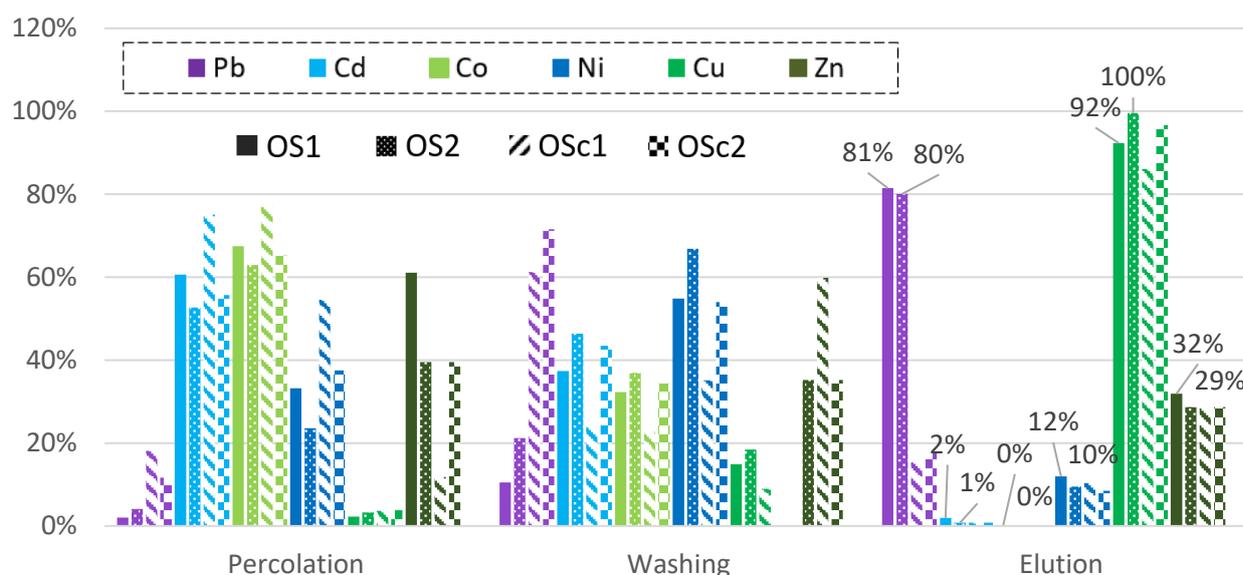


Figure 32. Extraction profiles of Pb(II) and other ions (Cd(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II)) on OS1 (full histograms), OS2 (dotted histograms), OSc1 (hatched histograms) and OSc2 (square histograms). SPE procedure: percolation: 1 mL of MgCl₂ 5 mM spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II); Washing: 5 mL of the percolation solution; Elution: 3 x 250 μL of EDTA 1 mM. Waiting time of 7 min at room temperature.

IV.3.6. Oligoextraction of Pb(II) from serum samples

Once the performance of the two specific OSs was assessed using synthetic spiked solutions and the OS1 support appearing to be more efficient in terms of capacity, was selected for the extraction of lead ions from real serum samples. Prior to oligoextraction, an acid digestion procedure was achieved to eliminate proteins that might form complexes with Pb(II) and obstruct the SPE cartridge [226]. The digested serum was further centrifuged, and the resulting supernatant was either mixed with a solution of MgCl₂ for percolation on OS1 and analysis of the elution fraction by ICP-MS, or diluted with a 2% HNO₃ solution and subjected directly to ICP-MS analysis.

This protocol was applied to human serum, both non-spiked and spiked at concentrations ranging from 100 to 300 µg/L (n=3 for each concentration level). The results obtained using OS1 are provided in Figure 33. The measured concentrations were plotted as a function of the spiking levels. The concentration in the non-spiked serum was determined by extending the line to $y = 0$. Hyperbolas representing a 95% confidence interval were included to quantify the uncertainty on both sides of the untreated serum value. The Pb(II) concentration in non-spiked serum was found to be 87 µg/L, with a 95% confidence interval ranging from 62 to 117 µg/L. The slope of the curve facilitated the assessment of the extraction yield, resulting in a value of 72% with a standard deviation of 3.2% (n=7). This extraction yield is slightly lower than that obtained previously for spiked MgCl₂ solutions. This difference could be attributed to some loss of Pb(II) during the acid digestion step, as well as the accompanying centrifugation steps. When Pb(II) was analyzed in the diluted supernatant by ICP-MS without a prior oligoextraction step, the recovery rate was calculated at $67 \pm 0,2$ %. Although extraction yields were very similar with and without oligoextraction, it's important to note that fouling of the instrument was observed if no oligoextraction was performed. Furthermore, the initial concentration in the serum was determined to be 35 µg/L (confidence interval ranging from 34 to 37 µg/L) with no oligoextraction compared to 87 µg/L with oligoextraction (confidence interval ranging from 62 to 117 µg/L). Moreover, by applying the dilution factors and yields obtained to the instrumental limit of quantification, a LOQ of 2.8 µg/L is calculated for the determination of Pb(II) in serum when using oligoextraction compared to 4.02 µg/L without oligoextraction.

Thus, the oligoextraction step helps to prevent from fouling the ICP-MS and to reach lower limit of quantification.

Additionally, it's also important to note that over 60 extraction procedures were carried out in pure media over a period of 18 months with no evidence of retention deterioration during this extended period. In addition, a study of the reuse of the OS in real samples was undertaken and it is impressive to note that, even after more than 15 oligoextraction procedures applied to serum samples, no decrease in retention efficiency was observed. These results collectively underline the stability and reliability the OS.

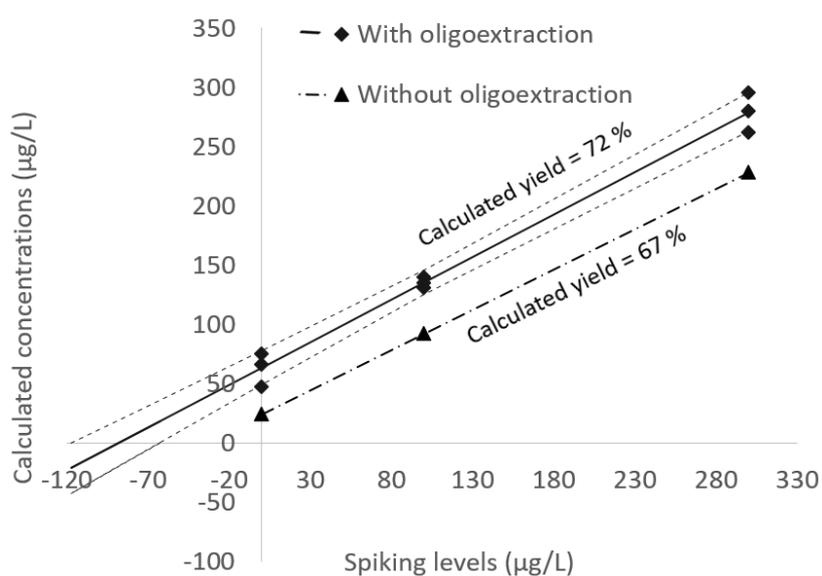


Figure 33. Calibration curves for the analysis of Pb(II) in a human serum submitted to an acid digestion step and with (solid lines and square markers) or without (dotted lines and triangle markers) oligoextraction on OS1. Spiking levels in serum are between 0 to 300 µg/L. The 95% confidence hyperbolas for the results with oligoextraction are shown as dotted lines

Conclusion

The aim of this study was to develop an aptamer-functionalized extraction sorbent for the selective and specific extraction of Pb(II). The two sequences identified in the literature as specific for Pb(II) have demonstrated their potential for the selective extraction of Pb(II). In the course of this work, control sorbents composed of non-specific aptamers were prepared

and used to evaluate the actual selectivity and specificity of the retention procedure by studying the retention of lead ions but also of other cations on the two types of sorbents, the specific and the control. This study also shown the strong effect of the nature of the percolation medium on selectivity and specificity. After optimizing the selective extraction procedure in pure media and having determine the capacity, oligoextraction was applied to the determination of Pb(II) in serum samples. These experiments shows that extraction recoveries obtained for the extraction of the target ions from serum sample were closed to those obtained in pure media. This was compared with an extract that had not undergone oligoextraction, demonstrating a significant difference in measured concentration in the serum compared to that obtained through simple dilution and also limiting ICP-MS fouling. Several future perspectives can be envisaged, such as the use of the solid support on other matrices such as food matrices like milk. Finally, in view of the high specificity achieved by the extraction support, it is possible to envisage the use of less specific but also less costly instruments than ICP-MS, such as atomic absorption spectroscopy.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Appendix

Supplementary data

Author Contributions

Conceptualization: V. Pichon, N. Delaunay. Formal analysis and investigation: F. Gignac. Writing-original draft preparation: F. Gignac. Writing-review and editing: V. Pichon, N. Delaunay. Funding acquisition: V. Pichon. The manuscript was written through contributions of all authors.

Conclusion du chapitre et travaux complémentaires

Au cours de ce chapitre, deux supports d'extraction à base d'aptamères ont été développés pour extraire le plomb de matrices complexes. Pour cela deux séquences constituées de motif de répétition de guanines ont été sélectionnées pour leur capacité à former une structure G-quadruplex, cette dernière étant stabilisée par Pb(II). Au cours du développement analytique, il a été une fois de plus constaté, comme dans le chapitre précédent, que la nature du milieu de percolation influence grandement la spécificité et la sélectivité observée. Le développement du protocole analytique a aussi nécessité une attention particulière lors de l'optimisation de l'étape d'élution afin de réussir à éluer l'ensemble du plomb dans un volume minimal de solution. L'extraction sur échantillons de sérum a révélé une légère baisse du rendement d'extraction en comparaison à celui obtenu en milieu pur. Cependant, cette extraction permet de purifier l'échantillon, dont les concentrations en plomb sont ici mesurées par ICP-MS. Au vu de la forte spécificité constatée, il peut alors être envisagé de réaliser la quantification du plomb par des techniques moins spécifiques. Afin de pouvoir démontrer la forte affinité des séquences OS1 et OS2, une étude en collaboration avec l'équipe du Professeur Eric Peyrin (Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM), Université Grenoble Alpes) a été initiée. L'objectif était d'appliquer une méthode développée, dans le cadre de la thèse de Blandine Billet, permettant de calculer des constantes de dissociation (K_d) de chacune des séquences pour Pb(II) mais aussi pour Cd(II). Le cobalt n'a pu être utilisé car il entraîne un phénomène important de quenching de fluorescence. L'ensemble des mesures a été réalisé dans le milieu optimisé, c'est-à-dire $MgCl_2$ 5 mM. Pour la séquence AP1, les réponses obtenues pour Pb(II) et Cd(II) sont significativement différentes, avec un K_d mesuré pour Pb(II) de $8,6 \pm 5,4 \mu M$ contre $520 \pm 123,4 \mu M$ pour Cd(II). La séquence a donc une affinité plus importante pour Pb(II) que pour Cd(II). Cela correspond donc aux observations expérimentales de spécificité du support vis-à-vis du cadmium. Pour AP2, les réponses obtenues pour les deux ions ne sont pas significativement différentes ($70,9 \pm 23,4 \mu M$ pour Pb(II) contre $103 \pm 21,7 \mu M$ pour Cd(II)). Ces résultats ne confirment donc pas les observations expérimentales.

Chapitre V

**Développement de supports fonctionnalisés
par des aptamères pour l'extraction du
cuivre**

Chapitre V - Développement de supports fonctionnalisés par des aptamères pour l'extraction du cuivre d'échantillons de sérum

Après avoir étudié la spécificité et la sélectivité d'oligoadsorbants pour l'extraction du cadmium ainsi que du plomb, nous nous sommes intéressés au développement d'un oligoadsorbant pour l'extraction du cuivre. En effet, un polymère à empreintes ioniques ciblant les ions Cu(II) a été récemment synthétisé au laboratoire dans le cadre de la thèse de P. Cao [86,88], et après optimisation de la procédure d'extraction telle que démontré en Figure 8 du chapitre I, une très grande sélectivité et spécificité ont été obtenues en milieu pur mais également en milieu réel (eaux minérales et de mer). Le développement d'un oligoadsorbant de Cu(II) offre la possibilité de comparer les performances, avantages et limitations respectives de l'approche des IIP à celle des oligoadsorbants. Ceci fait donc l'objet de ce chapitre.

Concernant la bibliographie sur l'utilisation d'aptamères ciblant les ions cuivre, peu de séquences ont été rapportées (c.f. chapitre 2). Néanmoins, l'une d'entre-elles a fait l'objet d'une étude approfondie, la séquence 1 du tableau 11 [16]. Les auteurs ont réalisé l'ensemble du procédé SELEX pour identifier la séquence puis l'ont greffée sur un support pour réaliser l'extraction du cuivre en mode dispersif. Cependant, le mode de greffage non covalent sur de l'agarose activé streptavidine n'est pas le même que celui qui a été envisagé dans notre étude. De plus, l'étude de la sélectivité a été réalisée, mais le support contrôle était de l'agarose sans séquence greffée. Bien que très utile pour identifier de potentielles interactions non spécifiques des ions avec le support solide, cela n'apporte pas d'informations sur celles des ions avec les aptamères, c'est-à-dire avec les bases et le squelette sucre-phosphate. De plus, les auteurs ont déterminé les constantes de dissociation du cuivre et de certains ions interférents, sans pour autant démontrer que ces ions ne sont pas retenus sur le support.

L'objectif de ce chapitre est donc de développer des supports hautement spécifiques et sélectifs pour l'oligoextraction des ions cuivre. Pour cela, en plus de la séquence 1, deux autres séquences ont été choisies afin d'approfondir le mécanisme de rétention sur la séquence 1

ainsi qu'une séquence servant ici de contrôle. Ces séquences ont ensuite été greffées de façon covalente sur Sépharose activée CNBr et les taux de greffages ainsi que les capacités théoriques ont été déterminés. Par la suite, une étude des milieux de percolation permettant la rétention spécifique et sélective du cuivre a été réalisée.

V.1. Sélection des séquences

Comme expliqué dans le chapitre 2, peu de séquences présentant une forte affinité spécifique pour les ions cuivre ont été décrites. Cependant, une étude plus approfondie a été réalisée dans laquelle une séquence a été identifiée, la séquence 1 du tableau 11 [16]. Cet article est particulièrement intéressant puisque les auteurs ont cherché à déterminer le motif de la séquence permettant la rétention de Cu(II). Dans ce même article, les auteurs ont modélisé la séquence (Figure 34A) et ont mesuré un K_d de 18 pM. Cette constante de dissociation très faible traduit une forte affinité de l'aptamère pour le cuivre. Toujours dans cet article, les auteurs ont également modélisé une séquence délétée de certaines bases et ont constaté une augmentation de la constante de dissociation leur permettant d'émettre une hypothèse quant à la localisation du site de fixation du cuivre (séquence appelée par la suite séquence 1-D1). Le cuivre interagirait alors avec les tiges des deux premières boucles présentes en 5' de la séquence (zone identifiée sur la Figure 34A). Cette seconde séquence a donc été choisie pour être intégrée à notre étude afin de voir si la diminution du K_d rapportée dans la littérature se traduirait par une diminution de la rétention en SPE du cuivre sur un support solide greffé avec celle-ci (OS1-D1) par rapport à un OS greffé avec la séquence 1 non délétée (OS1). L'ensemble des séquences sélectionnées est présenté dans le tableau 16. Il est à noter que ces deux séquences sont constituées de respectivement 100 et 92 bases, ce qui constitue de longues séquences par rapport à celles déjà utilisées au laboratoire, de tailles comprises entre 15 et 40 bases. Puisque les auteurs ont identifié un site de rétention du cuivre sur la séquence 1, il est alors possible d'envisager de raccourcir cette séquence afin de s'approcher de la taille des séquences déjà greffées sur Sépharose CNBr activée au laboratoire.

Deux autres séquences d'intérêt ont donc été définies pour notre étude. La première, nommée 1-D2, est une séquence déléetée de la partie linéaire de la séquence 1 mais qui conserve le site identifié par les auteurs comme étant le site d'interaction spécifique des ions cuivre. Le support greffé avec cette séquence (OS1-D2) devrait donc se comporter comme celui sur lequel est greffée la séquence 1 (OS1), c'est-à-dire avoir une forte affinité pour Cu(II). La seconde séquence, nommée 1-D3, est une séquence pour laquelle les deux boucles visibles sur la modélisation de la séquence 1 dans la région de reconnaissance spécifique ont été déléetées, dont celle du site assurant supposément la rétention. Le support greffé avec cette séquence (OS1-D3) ne devrait donc pas retenir le cuivre et devrait nous servir de séquence contrôle pour évaluer la sélectivité des supports greffés avec les trois séquences décrites précédemment (1, 1-D1 et 1-D2). La modélisation de ces deux séquences est représentée en Figures 34C et 34D.

Les séquences ainsi sélectionnées ont été commandées avec une modification de l'extrémité 5' par ajout d'un groupement NH₂-C₆ pour être greffées sur Sépharose activée CNBr comme dans le cas des deux études précédentes.

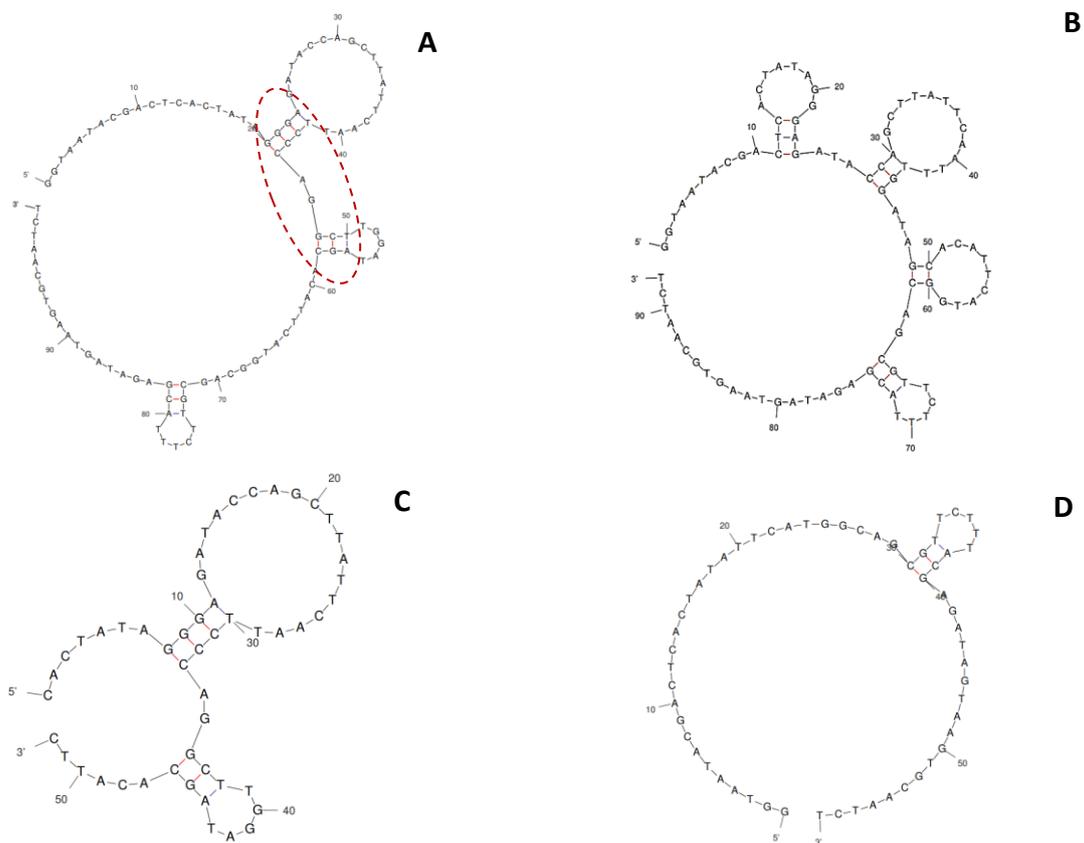


Figure 34. Modélisation des séquences sur le site *mfold* dans NaCl 150 mM à 25°C, avec en : (A) séquence 1 ;(B) séquence 1-D1 ;(C) séquence 1-D2 et (D) séquence 1-D3.

Tableau 16. Séquences et informations sur les aptamères choisis

Nom de la séquence	Nombre de bases	K_d (nM)	Informations complémentaires	Effet attendu pour le cuivre après greffage sur Sépharose
1	100	$1,89 \times 10^{-2}$	Séquence originale	Rétention
1 - D1	92	48,4	Délétion de la partie entre les boucles	Augmentation du K_d : quel effet sur la rétention ?
1 - D2	52	-	Délétion de la partie linéaire	Pas de modification de la rétention / OS1
1 - D3	58	-	Délétion des 2 boucles	Absence de rétention

V.2. Mesure des taux de greffage

Afin de déterminer le taux de greffage des quatre séquences précédemment sélectionnées sur de la Sépharose activée CNBr, les fractions issues de la mise en cartouche après greffage et des 3 premiers lavages du gel ont été récupérées et analysées par chromatographie en phase liquide de paires d'ions associée à une détection UV. Pour ce faire, une gamme d'étalonnage a été réalisée pour chaque aptamère, allant de 0,1 à 10 mg/L (Figure S27-S30). La connaissance de la quantité d'aptamères non greffés rapportée à la quantité d'aptamères introduits conduit au calcul du taux d'aptamères greffés sur le gel. Ce taux de greffage permet de calculer la capacité théorique des supports en supposant qu'une mole d'aptamères greffés interagit avec une mole d'ion cuivre. Ces données sont résumées dans le tableau 17. Les taux de greffage obtenus au LSABM pour d'autres séquences sont compris entre 20 et 50% [10]. Les taux de greffage obtenus sont bien compris dans cet intervalle, sauf pour OS1, dont le taux de greffage est de 18% alors que c'est l'aptamère le plus long (100 bases). Comme pour OS1-D1 greffé avec un aptamère de 92 bases, un taux de greffage de 31% a été obtenu, il semble que la taille des aptamères, plus élevée que celles des aptamères greffés jusque-là au laboratoire, n'a pas impacté le greffage des aptamères sur le gel de Sépharose. Cependant, les capacités théoriques étant calculées selon un rapport mole à mole, ces dernières sont particulièrement faibles à cause des grandes masses molaires des aptamères au regard de celle du cuivre.

Tableau 17. Taux de greffage et capacité théorique pour les aptamères greffés

Oligo-adsorbant	Quantité introduite (µg)	Masse molaire (g/mol)	Nombre de moles d'aptamères greffés (nmol)	Quantité d'aptamères greffés (µg)	Taux de greffage (%)	Capacité théorique du support pour Cu (II) (ng)
OS1	150	31033,3	0,870	27	18	55
OS1-D1		28600,7	1,626	46,5	31	103
OS1-D2		16125,6	3,349	54	36	213
OS1-D3		18048,9	3,407	61,5	41	217

V.3. Extraction sur phase solide avec les oligoadsorbants synthétisés

Dans les chapitres 3 et 4, il a été démontré que le choix du tampon de percolation et de lavage avait une forte influence sur la spécificité et la sélectivité de ce type de supports. Il est donc important de bien les sélectionner également dans cette étude. Tout d'abord, le tampon envisagé a été celui décrit par les auteurs ayant réalisé l'ensemble du processus SELEX [16], composé de Na_2HPO_4 (20 mM), NaCl (150 mM) et d'imidazole (1 mM), pH 5,5. Cependant, l'imidazole étant corrosif et toxique pour l'organisme, il a été décidé dans un premier temps de ne pas l'utiliser. Les premiers essais ont donc été réalisés dans du Na_2HPO_4 (20 mM) et NaCl (150 mM), pH 5,5. De plus, afin de pouvoir étudier la spécificité des supports, les ions Ni(II) , Pb(II) et Cd(II) ont été choisis comme ions interférents. Ni(II) a été sélectionné car c'est un métal de transition comme Cu(II) possédant donc des caractéristiques proches (taille et charge, lacune électronique). De plus, l'IIP spécifique au cuivre développé par Pengchao Cao au cours de sa thèse avait présenté une bonne spécificité vis-à-vis du Ni(II) (faible rétention comparée aux ions cuivre) après l'optimisation du protocole SPE. Par ailleurs, comme expliqué dans le chapitre 4, Pb(II) présente une affinité particulière pour les bases guanines et comme les séquences sélectionnées en contiennent, cela en fait donc un élément de choix pour caractériser la spécificité de la rétention sur ces oligoadsorbants. Enfin, Cd(II) a été ajouté comme autre ion interférent, puisque son comportement sur des oligoadsorbants a été largement étudié précédemment lors de ce travail. Les gammes d'étalonnage en ICP-MS réalisées pour ces quatre ions sont présentées dans l'annexe 3, ainsi que leurs limites de quantification (LQ). Il est à noter que lors des SPE, les rendements ont été calculés en analysant en ICP-MS la solution de percolation sans passage sur les cartouches afin de pouvoir corriger la concentration obtenue après la procédure d'extraction en tenant compte de la concentration exacte de dopage.

La solution de percolation a été dopée à une concentration de 5 $\mu\text{g/L}$ pour chacun des quatre ions analysés afin de ne pas dépasser la capacité théorique des supports. Chaque OS a été conditionné avec 1 mL de la solution tampon. La percolation a été réalisée avec 1 mL de la solution de tampon dopée. Chaque OS a ensuite été lavé avec 2 x 1 mL de la solution tampon (non dopée). Pour finir l'élution a été réalisée par 2 x 1 mL d'EDTA 10^{-4} M, pH 6. Les taux de

récupération obtenus dans chaque fraction et pour chaque ion sont présentés en Figure 35. Il apparaît que pour OS1, OS1-D1 et OS1-D2, les ions interférents sont élués principalement dans les fractions de percolation et de lavage sur tous les supports alors que le cuivre est élué comme attendu lors de l'éluion, les supports sont donc bien spécifiques au cuivre. Cependant, le cuivre sort également à l'éluion sur OS1-D3, support dit de contrôle, indiquant une absence de sélectivité.

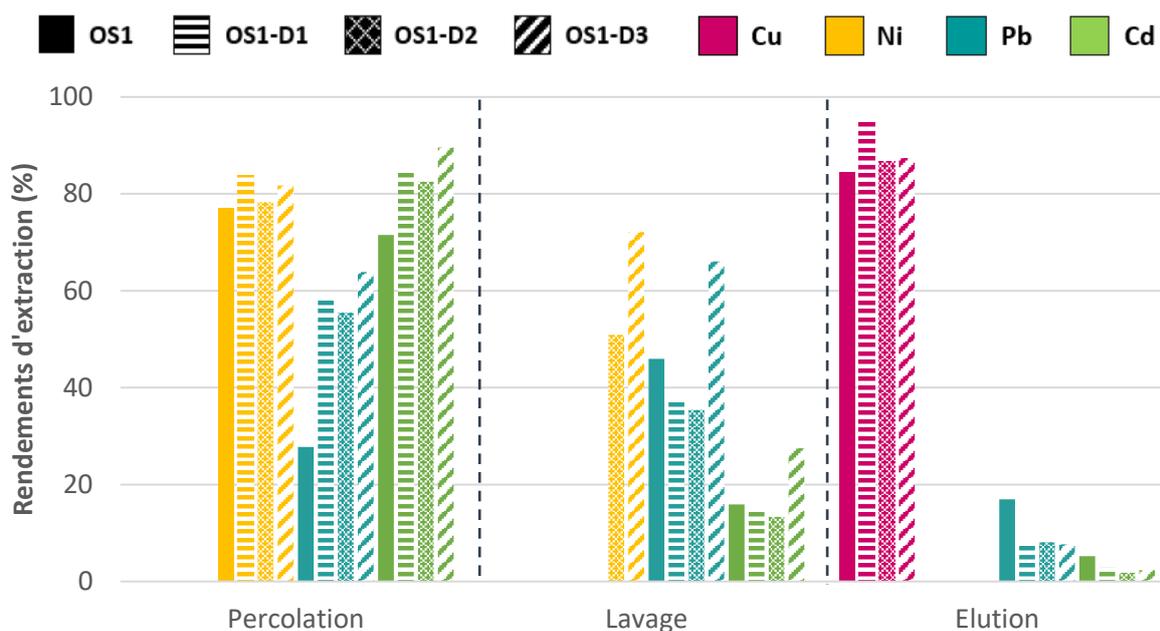


Figure 35. Profil d'extraction de Cu(II), Ni(II), Pb(II) et Cd(II) sur OS1, OS1-D1, OS1-D2 et OS1-D3 percolés dans Na_2HPO_4 20mM + NaCl 150 mM. Procédure SPE : Percolation : 1 ml de tampon Na_2HPO_4 20 mM + NaCl 150 mM, pH 5,5 dopé à 5 $\mu\text{g/L}$ en Cu(II), Ni(II), Pb(II) et Cd(II) ; Lavage : 2 x 1 mL de tampon Na_2HPO_4 20 mM + NaCl 150mM, pH 5,5 ; Elution : 2 x 1 mL d'EDTA 10^{-4} M, pH 6.

En faisant l'hypothèse que le cuivre a été retenu sur OS1-D3 par des interactions non spécifiques, par les groupements phosphate de l'ADN par exemple, 1 mM d'imidazole (ImH), dont l'utilisation a été rapportée par le groupe ayant décrit ces séquences, a été ajouté au tampon [16]. En effet, l'imidazole est un complexant du cuivre, il peut donc être un compétiteur avec les sites d'interactions non spécifiques des OS. Les profils d'extraction alors obtenus pour OS1 et OS1-D3 sont présentés sur la Figure 36 (OS1-D1 et OS1-D2 se comportant

comme OS1, ils n'ont pas été représentés afin de faciliter la lecture). Ils montrent qu'en présence d'imidazole les ions interférents sont, comme avec le précédent protocole, élués lors de la percolation et du lavage, la spécificité des supports est donc conservée. Cependant, malgré la présence d'une contamination en cuivre dans la fraction de lavage d'OS1, les profils d'extraction sont similaires à ceux obtenus avec le tampon sans imidazole qui n'a donc pas provoqué l'effet escompté.

L'une des hypothèses envisagées a donc été que la concentration d'imidazole était insuffisante pour rompre les interactions non spécifiques, puisque le cuivre était resté fixé sur le support OS1-D3 jusqu'à l'étape d'éluion. Elle a donc été augmentée à 10 mM. Les profils d'extraction obtenus sont présentés en Figure 36. Lorsque la concentration d'imidazole est de 10 mM, du cuivre est élué lors de la percolation et du lavage sur OS1 et OS1-D3, mais l'ajout d'imidazole 10 mM ne semble pas avoir permis d'améliorer la sélectivité du support OS1.

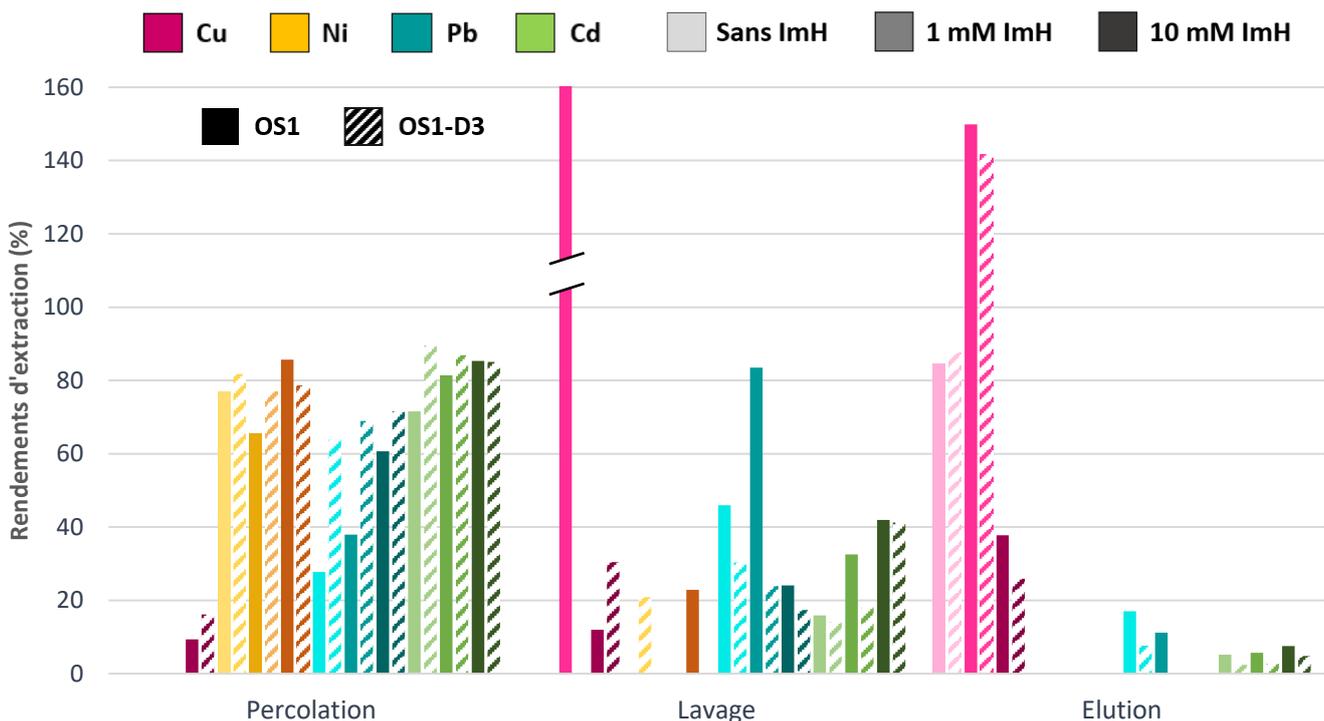


Figure 36. Profil d'extraction de Cu(II), Ni(II), Pb(II) et Cd(II) sur OS1 et OS1-D3 percolés dans Na_2HPO_4 20mM + NaCl 150 mM + imidazole 0 ; 1 ; 10 mM. Procédure SPE : Percolation : 1 ml de tampon Na_2HPO_4 20mM + NaCl 150 mM + imidazole 0 ; 1 ou 10 mM, pH 5,5 dopé à 5 $\mu\text{g/L}$ en Cu(II), Ni(II), Pb(II) et Cd(II) ; Lavage : 2 x 1 mL de tampon 20 mM Na_2HPO_4 + 150mM NaCl + imidazole 0 ; 1 ou 2 mM, pH 5,5 ; Elution : 2 x 1 mL d'EDTA 10^{-4} M, pH 6.

Cependant, les rendements totaux obtenus lors de cette expérience avec 10 mM d'imidazole ont été faibles (de l'ordre de 60-70 %) et il est donc difficile de conclure. Ceci est peut-être lié au fait que la LOQ du cuivre est de 0,06 µg/L, or certaines fractions n'étaient pas quantifiables car les signaux se trouvaient entre les limites de quantification et de détection. Ce phénomène était moins présent dans les manipulations précédentes car le cuivre n'était élué que dans une fraction d'élution et non dans la percolation, le lavage et l'élution. Ainsi, une solution dopée uniquement en cuivre a été utilisée afin de pouvoir augmenter sa concentration dans le milieu de percolation sans risquer de dépasser la capacité des supports. Cela permet alors de diminuer le rendement minimal quantifiable dans une fraction (6 % contre 12 % précédemment).

La concentration en cuivre de la solution de percolation (Na_2HPO_4 20 mM + NaCl 150 mM + imidazole 10 mM, pH 5,5) a donc été augmentée jusqu'à 10 µg/L et une nouvelle extraction a été réalisée. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 37. Sur cette même figure ont aussi été ajoutés les précédents résultats obtenus pour un dopage de 5 µg/L. On constate dans un premier temps que les rendements totaux obtenus à 10 µg/L sont supérieurs à ceux obtenus pour un dopage de 5 µg/L (80% contre 60% pour OS1). La fraction pour laquelle l'augmentation du dopage a un effet le plus significatif est celle de lavage. En effet, deux fois plus de cuivre est retrouvé dans cette fraction après passage à 10 µg/L. Cependant, les profils d'extraction n'ont pas changé puisque le rendement sur le contrôle a aussi augmenté de manière proportionnelle. L'augmentation de la concentration en imidazole n'a donc pas permis d'améliorer la sélectivité du protocole d'extraction réalisé sur le support OS1 par rapport à OS1-D3. Par ailleurs, la présence d'imidazole dans le tampon apportant en ICP-MS de nombreux effets de matrice sans pour autant améliorer la sélectivité de l'extraction, l'imidazole n'a plus été utilisé par la suite. Néanmoins, l'idée d'introduire dans le milieu de percolation et/ou de lavage un agent compétiteur semblait intéressante et nous avons donc décidé d'évaluer d'autres complexants du cuivre.

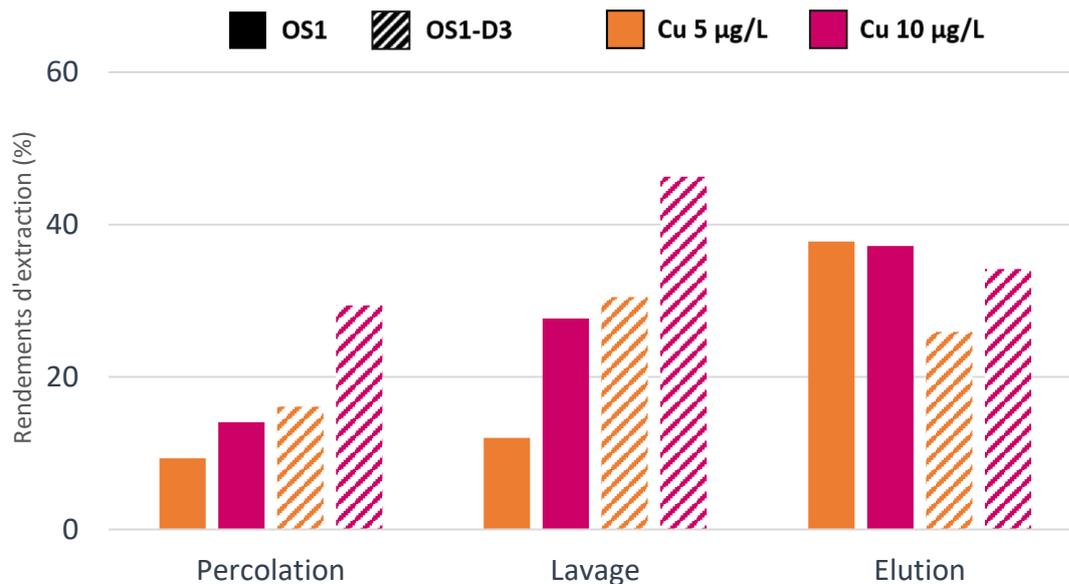


Figure 37. Profil d'extraction de Cu(II) sur OS1 et OS1-D3 percolé dans Na_2HPO_4 20mM + NaCl 150 mM + imidazole 10 mM, pH 5,5. Procédure SPE : (A) : Percolation : 1 ml de tampon Na_2HPO_4 20mM + NaCl 150 mM + imidazole 10 mM, pH 5,5 dopé à 10 µg/L en Cu(II) ; Lavage : 2 x 1 mL de tampon 20 mM Na_2HPO_4 + 150mM NaCl + imidazole 10 mM, pH 5,5 ; Elution : 2 x 1 mL d'EDTA 10^{-3} M, pH 6.

Tout d'abord, l'EDTA a été sélectionné du fait de sa constante de complexation élevée avec le cuivre, dont la valeur est de $10^{19,1}$ [227]. Dans un premier temps, une extraction a été réalisée dans le tampon Na_2HPO_4 20 mM + NaCl 150 mM, pH 5,5 dopé à 10 µg/L suivie de lavage successif avec 1 mL d'EDTA en concentration croissante (de 10^{-7} à 10^{-3} M). Le cuivre a été alors élué sur les deux supports (OS1 et OS1-D3) dans la fraction composé d'EDTA 10^{-5} M, pH 6 et les rendements totaux étaient égaux à 80%. Une seconde extraction a alors été réalisée dans le même tampon de percolation (Na_2HPO_4 20 mM + NaCl 150 mM, pH 5,5 dopé à 10 µg/L), suivi d'un lavage dans ce même milieu mais non dopé. L'éluion a été ici composée de fractions successives d'EDTA en concentrations croissantes allant de 10^{-5} à 10^{-4} M uniquement, mais en ajoutant un temps d'attente lors du passage sur le support de l'EDTA à 10^{-4} M, pH 6, afin de voir si le problème de rendement total inférieur à 100 résultait d'un phénomène cinétique, comme cela avait le cas avec les supports spécifiques au plomb. Le profil obtenu est présenté sur la Figure 38A. Le cuivre a été de nouveau élué à partir de la fraction d'EDTA à une concentration de 10^{-5} M sur les deux supports. Concernant le temps d'attente, cela n'a pas eu

d'impact sur les rendements totaux observés comme cela avait été observé pour les supports spécifiques au plomb. Pour conclure sur l'EDTA, l'ajout de fractions de concentrations croissantes d'EDTA ne nous a pas permis d'améliorer la sélectivité d'OS1, puisque son contrôle présente des profils d'extraction similaires à ce dernier.

Par la suite l'utilisation du BES comme complexant a été étudié. En effet, il a été décrit comme pouvant interagir et former des complexes avec l'ADN [228]. La percolation a été réalisée dans le tampon Na_2HPO_4 20 mM + NaCl 150 mM, pH 5,5 dopé à 10 $\mu\text{g/L}$, suivie d'un lavage dans ce même tampon non dopé. En ce qui concerne l'élution, un gradient successif de concentrations de BES compris entre 10^{-5} M et 10^{-3} M suivi de deux fractions d'EDTA à 10^{-4} M, pH 6 afin d'assurer l'élution du cuivre percolé a été mis en œuvre. Les profils SPE obtenus sont présentés sur la Figure 38B. Il apparaît que cela n'a pas permis d'améliorer la sélectivité car le cuivre a été élué uniquement lors de l'ajout de l'EDTA.

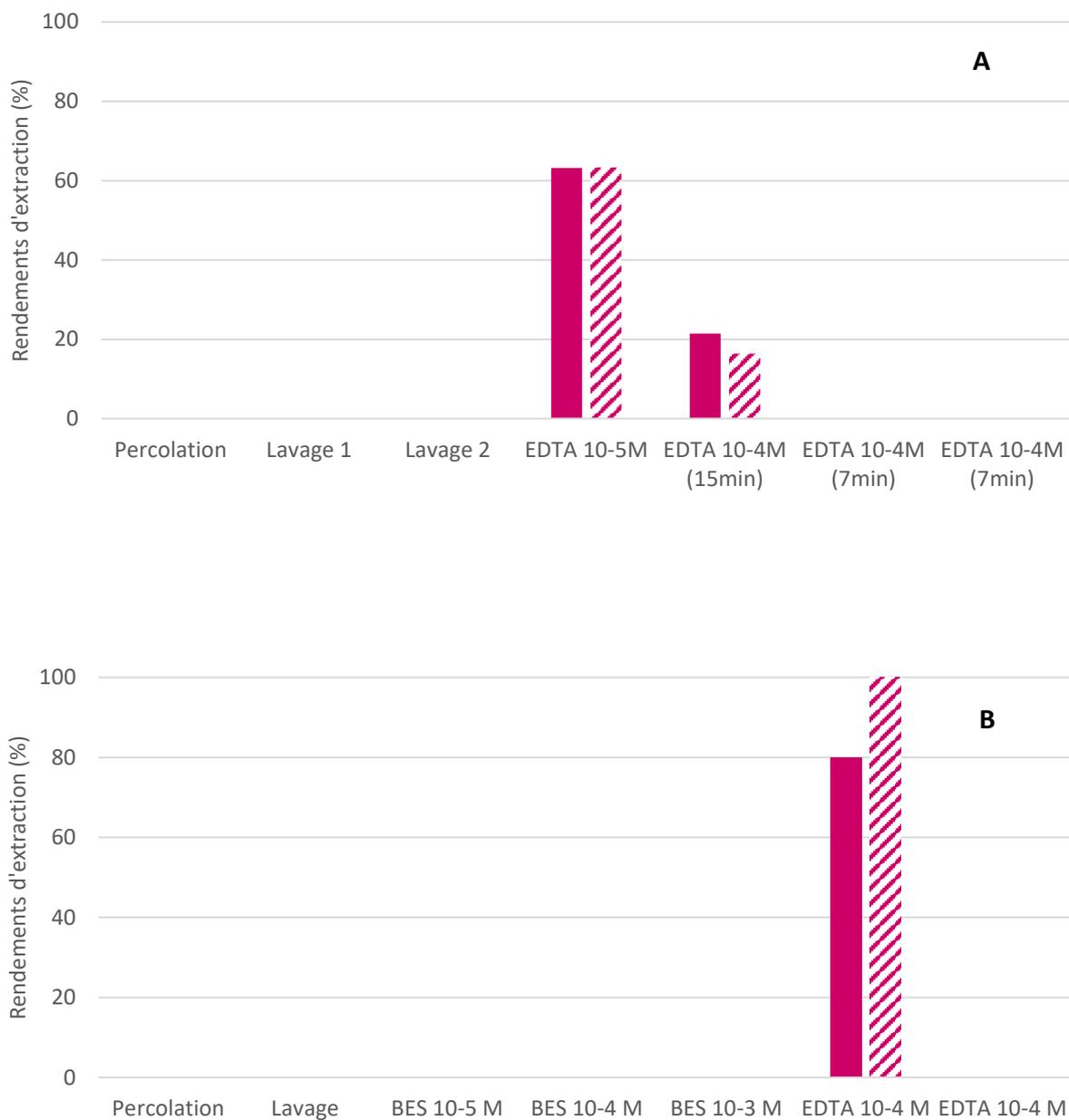


Figure 38. Profil d'extraction de Cu(II) sur OS1 et OS1-D3 avec (A) l'EDTA comme éluant, (B) le BES et l'EDTA comme éluant. Procédure SPE : (A) : Percolation : 1 ml de tampon Na₂HPO₄ 20 mM + NaCl 150 mM, pH 5,5 dopé à 10 µg/L en Cu(II) ; Lavage : 2 x 1 mL de tampon Na₂HPO₄ 20 mM + NaCl 150 mM, pH 5,5 ; Elution : 4 x 1 mL d'EDTA (10⁻⁵ à 10⁻⁴ M, pH 6). (B) Percolation : 1 ml de tampon Na₂HPO₄ 20 mM + NaCl 150 mM, pH 5,5 dopé à 10 µg/L en Cu(II) ; Lavage : 1 mL de tampon Na₂HPO₄ 20 mM + NaCl 150 mM, pH 5,5 ; Elution : 3 x 1 mL de BES (10⁻⁵ à 10⁻³ M) suivi de 2 x 1 mL d'EDTA 10⁻⁴ M, pH 6.

Compte tenu du peu de différences de comportement observées entre OS1 et OS1-D3 pour le cuivre, le fait que la séquence OS1-D3 soit réellement un contrôle, comme décrit par les auteurs [16], a été remis en question. Un autre support contrôle a alors été choisi, le gel de Sépharose activée CNBr ayant subi le passage des réactifs de greffage mais sans avoir introduit d'aptamères (appelé OSNG). Des procédures SPE ont été réalisées en reprenant le protocole initial, tout d'abord dans le tampon NaHPO_4 (20 mM) + NaCl (150 mM), pH 5,5 puis en y ajoutant 1 mM d'imidazole, puis 2 mM d'imidazole. Les profils d'extraction obtenus sont présentés en Figure 39. Il apparaît que, quelle que soit la concentration d'imidazole présente dans le milieu, le cuivre est désorbé dans la grande majorité des cas lors de l'élution que ce soit sur OS1 ou sur le support non greffé. La Sépharose entraîne donc la rétention du cuivre et cela explique donc pourquoi quelle que soit la séquence d'oligonucléotides qui a été greffée, le cuivre était retenu de la même manière sur tous les supports.

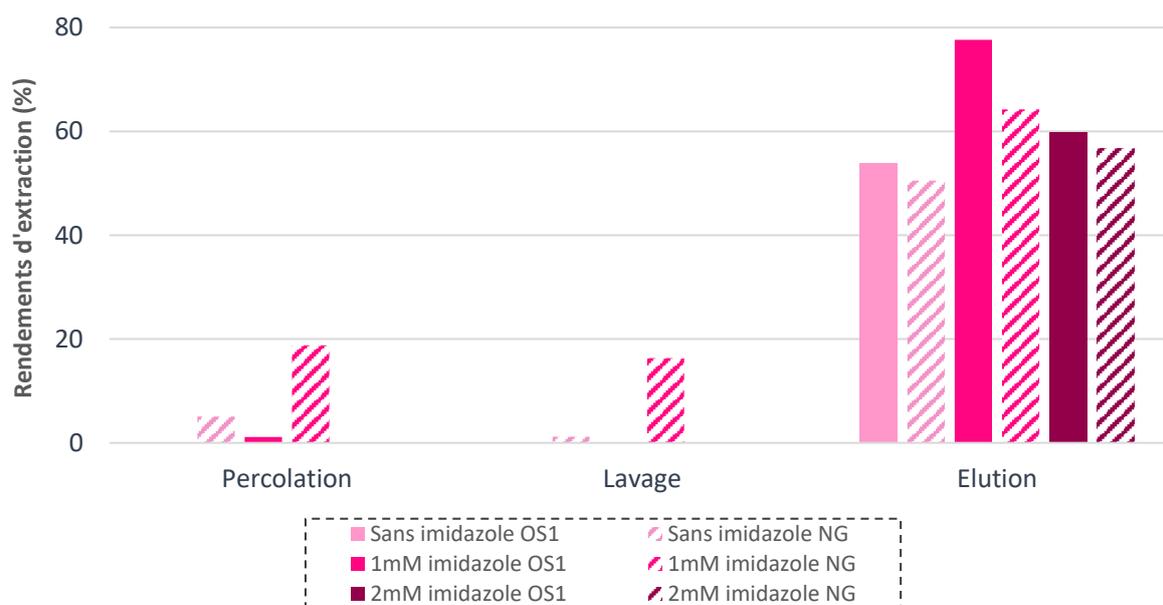


Figure 39. Profil d'extraction de Cu(II) sur OS1 et OSNG dans Na_2HPO_4 20mM + NaCl 150 mM + imidazole 0 ; 1 ; 2 mM. Procédure SPE : Percolation : 1 ml de tampon Na_2HPO_4 20 mM + NaCl 150 mM + imidazole 0 ; 1 ou 2 mM, pH 5,5 dopé à 10 $\mu\text{g/L}$ en Cu(II) ; Lavage : 2 x 1 mL de tampon Na_2HPO_4 20 mM + NaCl 150mM + imidazole 0 ; 1 ou 2 mM, pH 5,5 ; Elution : 2 x 1 mL d'EDTA 10^{-4} M, pH 6.

Conclusion

Cette étude avait pour objectif de développer des supports à base d'aptamères spécifiques du cuivre afin de pouvoir comparer leurs performances avec les supports d'IIP déjà développés au laboratoire. Une fois les séquences identifiées dans la bibliographie ainsi qu'une séquence contrôle choisie, ces dernières ont été greffées. Les taux de greffage obtenus (entre 18 et 41%) ont été similaires à ceux décrits dans la littérature, à l'exception d'OS1 dont la valeur se situe en dessous du seuil de 20 %. Cependant, la séquence OS1-D2, délétée de seulement 8 bases a été greffée avec des taux satisfaisant (31%). Il a donc été conclu que la taille des aptamères n'avait pas d'influence sur le taux de greffage obtenu. Par la suite, des extractions en milieu pur dopé ont été réalisées afin de pouvoir caractériser les performances des supports. Pour cela, des tampons phosphate contenant différentes concentrations d'imidazole ont été testés afin d'améliorer la rétention, la spécificité et la sélectivité du cuivre sur les supports OS1, OS1-D1 et OS1-D2. Une bonne spécificité vis-à-vis de Pb(II), Cd(II) et Ni(II) a été observée pour tous les supports, spécifiques mais aussi de contrôle. Cependant, quel que soit le milieu testé, aucune sélectivité n'a été observée. Des extractions ont donc été réalisées en utilisant un support de Sépharose non greffé et une très forte rétention du cuivre a également été observée, ce qui a permis de conclure qu'il n'était pas possible d'évaluer la sélectivité avec des oligoadsorbants constitués de Sépharose dans le cas d'aptamères ciblant le cuivre, comme cela a pu être fait pour les supports spécifiques au cadmium et au plomb. Il est à noter que dans l'article identifiant les séquences étudiées, la sélectivité avait été démontrée, mais c'est de l'agarose activée par de la streptavidine qui avait été choisie comme support solide de greffage non covalent d'aptamères biotynilés. Par ailleurs, même sur le support non greffé, la spécificité par rapport aux autres ions a été observée. Cela peut s'expliquer avec la série d'Irving-Williams : $Fe(II) < Co(II) < Ni(II) < Cu(II) > Zn(II)$ [229], qui indique une plus grande stabilité des complexes formés par les ions cuivre par rapport aux autres ions divalents pour de très nombreux complexants. Cela constitue donc une observation rassurante concernant les autres supports développés pour le plomb et le cadmium, puisque ces ions ne sont pas retenus sur la Sépharose non greffée comme observé ici.

Une immobilisation des séquences sur un gel d'agarose streptavidine pourrait donc être envisagée afin de vérifier que les résultats obtenus en SPE soient similaires à ceux décrits dans l'article de référence [16]. Une autre possibilité serait de conserver un greffage sur la Sépharose activée CNBr, mais en réalisant un prétraitement du gel afin de tenter de bloquer les sites susceptibles de réagir ensuite avec le cuivre. Par la suite, l'étude de la spécificité et de la sélectivité sera finalisée, afin d'apporter ces informations manquantes dans l'article de référence développant le protocole de dSPE [16]. Enfin, une fois le ou les supports développés et les conditions d'extraction optimisées, les performances observées sur ces supports pourront être comparées aux IIP développés dans le cadre de la thèse de Pengchao Cao [86].

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail de thèse a porté sur le développement de supports à base d'aptamères spécifiques aux ions Cd(II), Pb(II) et Cu(II) afin d'extraire ces derniers d'échantillons complexes par un procédé sélectif d'extraction sur phase solide.

Dans un premier temps, une étude bibliographique sur les méthodes de quantification ainsi que sur les supports d'extraction conventionnels a souligné la nécessité de développer des supports hautement spécifiques pour extraire des métaux présents à l'état de traces dans des matrices complexes variées. Ces supports devraient permettre notamment d'éliminer les effets de matrice rencontrés avec des instruments de mesure très sensibles tels que l'ICP-MS, mais aussi d'envisager l'utilisation d'instruments de quantification moins spécifiques mais aussi moins coûteux.

Puis, après avoir présenté les différents supports hautement spécifiques en cours de développement ainsi que leurs limites, nous nous sommes concentrés sur les aptamères. Ainsi, une étude bibliographique approfondie des aptamères, de leur mode de sélection ainsi que de leur utilisation dans le cadre de la SPE, a permis de démontrer leur fort potentiel pour l'extraction de molécules. Concernant les ions métalliques, très peu de travaux ont mis en œuvre des aptamères pour leur extraction, mais ils ont été fortement utilisés pour développer des capteurs. Une étude bibliographique a donc été réalisée en regroupant les développements faits dans le domaine des capteurs et de la dSPE. Il en a alors été conclu que pour chacune de nos cibles des séquences semblaient prometteuses pour le développement de supports d'extraction. Cependant, certaines informations restaient inconnues telles que la spécificité des capteurs développés et surtout leur sélectivité, paramètre très peu étudié par les auteurs. De plus, de nombreuses données telles que les constantes de dissociation, la composition exacte des milieux de mesure utilisés ou encore le protocole de régénération des supports ou surfaces fonctionnalisés étaient manquantes. Une fois les séquences les plus prometteuses identifiées pour chacun des ions cibles, des séquences contrôles ont été sélectionnées pour étudier la sélectivité des supports. Les séquences ont alors été greffées sur Sépharose et les taux de greffages ont été déterminés.

Les deux premières études portant sur le développement de supports spécifique au cadmium et au plomb ont mis en évidence la très forte influence du milieu de percolation sur les performances analytiques constatées, telles que la spécificité et la sélectivité. En effet, dans la bibliographie, de nombreux milieux de mesure ont été utilisés par les auteurs. Cependant, en n'étudiant pas la spécificité et la sélectivité, des différences de comportement des ions et des supports dans chacun des milieux testés n'ont pas été observées. Pourtant, un manque de spécificité et de sélectivité peut entraîner la co-extraction d'autres ions, diminuant les performances du protocole analytique. Une fois le milieu optimal de percolation déterminé pour chacun des ions cibles, la capacité des supports retenus a été mesurée, permettant de conclure quant à la possibilité de les utiliser pour extraire Cd(II) et Pb(II) à des niveaux de concentrations attendus dans des échantillons de sérum. Il est à noter qu'une étude de la cinétique d'élution du plomb a été réalisée afin de limiter la dilution lors de l'élution de ce dernier des supports. Cette étude ne s'était pas révélée nécessaire dans le cadre de l'élution du cadmium de son support. Enfin, les protocoles d'extraction développés ont permis d'extraire avec succès le cadmium et le plomb d'échantillons de sérum. La suppression des effets de matrice a aussi été démontrée, notamment dans le cas du cadmium, par comparaison de l'analyse en ICP-MS de l'extrait obtenu après oligoextraction avec un extrait de sérum simplement soumis à une digestion acide et à une dilution.

Enfin, un dernier support spécifique au cuivre est en cours de développement. Les séquences sélectionnées sont issues d'un article développant des supports de SPE. Les premières expériences sur ce support ont mis en lumière un phénomène qui n'avait pas été observé pour les deux autres ions, c'est-à-dire une rétention non spécifique du cuivre sur le support solide, la Sépharose. Il est donc envisagé de changer le mécanisme de greffage des séquences en utilisant un support d'agarose activée Streptavidine. Ce support semble prometteur, car il a été utilisé dans la bibliographie et les auteurs n'avaient alors pas observé de rétention non spécifique du cuivre.

L'ensemble de ces développements nous a permis de se confronter à une différence significative par rapport aux supports développés pour extraire des molécules organiques. En effet, dans le cadre du développement de supports pour les molécules organiques, les auteurs

utilisent de manière conventionnelle le tampon de sélection comme milieu de percolation. Dans notre cas, cela ne permet pas d'atteindre les performances analytiques souhaitées.

Bien que le développement de ces supports ait été réalisé avec succès, quelques désavantages sont à souligner. L'un des inconvénients majeurs est le manque d'effet de préconcentration généré par la procédure d'extraction et d'analyse. L'un des paramètres influençant le facteur d'enrichissement est le volume d'échantillon percolé. Malheureusement, sur ces supports, le volume maximal pouvant être percolé sans constater d'élution prématurée des analytes est de 1 mL pour 30 mg de phase. Cette problématique pourrait être compensée par de faibles volumes d'élution. C'est pour cette raison que dans le cadre du développement du support plomb, une étude approfondie de la cinétique d'élution a été réalisée afin de minimiser le volume d'élution nécessaire pour éluer les ions cibles. Dans le cadre du développement du support cadmium, les volumes d'élution ont été fixés à 2 x 500 μ L et regroupés en une fraction afin d'éluer les ions retenus sur le support. Cependant, ces volumes d'élutions sont encore trop élevés pour concentrer les échantillons. Un autre point limitant est le volume minimal d'échantillon nécessaire afin de réaliser une mesure en ICP-MS. En effet, avec le montage actuel, il est nécessaire d'obtenir un volume final pour chaque fraction de 2 mL. En tenant compte de la dilution réalisée dans l'acide nitrique qui est au minimum de 1/3, 0,7 mL de solution d'élution sont donc nécessaires pour réaliser la mesure. Cependant, le changement de passeur d'échantillon pour un micro-passeur, permettant de diminuer drastiquement les volumes nécessaires pour mesurer les concentrations de chaque fraction, peut être envisagé.

En perspectives, il peut être envisagé de miniaturiser les supports développés au format macroscopique. En effet, des études précédentes réalisées au laboratoire ont démontré la possibilité de greffer les aptamères sur des monolithes synthétisés en capillaire. Cela pourrait permettre de coupler le système d'extraction à l'ICP-MS, limitant de ce fait les manipulations ainsi que les possibles contaminations qui ont pu être constatées tout au long de cette thèse. Il peut aussi être envisagé d'utiliser une méthode de quantification des ions contenus dans la fraction d'élution moins spécifique telle que l'électrochimie. En effet, le développement de ces supports hautement spécifiques pourrait permettre de s'affranchir de l'utilisation d'instruments tels que l'ICP-MS, nécessitant du personnel qualifié et des coûts d'achat et de fonctionnement élevés. Il devrait être aussi possible d'envisager l'utilisation de ces supports

hautement spécifiques combinés à des mesures de terrain. L'une des interrogations issues de ce travail est la compréhension des phénomènes liés à la rétention des ions métalliques sur le support. En effet, la mesure des constantes de dissociation réalisée en collaboration avec l'équipe du Professeur Peyrin (Département de Pharmacochimie Moléculaire) a permis de confirmer une affinité du plomb pour la séquence 1. Cependant dans le cadre du cadmium, cela ne nous a pas permis de confirmer les résultats expérimentaux. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les phénomènes d'interactions des ions avec les aptamères. Cela inclut notamment une meilleure compréhension du changement de conformation des aptamères en fonction du milieu dans lequel ces derniers se trouvent. Enfin, une fois les supports spécifiques au cuivre développés, ces derniers pourront être comparés aux IIP spécifiques au cuivre développés dans le cadre de la thèse de Pengchao Cao. Cela permettra d'identifier les avantages et les inconvénients de chacun des supports et donc de mieux choisir la nature du support à sélectionner en fonction de ces observations pour de futurs développements.

ANNEXES

Annexe 1 : Supplementary information - Chapitre III - Article 1

$$\text{Limit of quantification} = \frac{10 \sigma}{k}$$

Equation S1. equation for calculating the limit of quantification. σ is the standard deviation in counts per second (cps) of 10 blank solutions (in 2% HNO₃) and k the sensitivity of the instrument (cps/ μ g/L)

Table S1. LOQ of ⁵⁹Co, ²⁰⁸Pb, ⁶³Cu, ²⁴Mg, ⁶⁰Ni and ⁶⁶Zn in 2% HNO₃ determined by ICP-MS using Equation S1.

Element	LOQ (ng/L)
Cobalt	1
Lead	45
Copper	51
Magnesium	508
Nickel	44
Zinc	224

Table S2. Cd(II) concentration average, standard deviation and RSD values calculated for each calibration solution analyzed in replicate (n= 3) in 2% HNO₃ in ICP-MS.

Concentration of calibration solutions (ng/L)	Average values and standard deviation (ng/L)	RSD (%)
0.5	0.53 ± 0.06	10.7
1	1.13 ± 0.14	12.1
3	3.02 ± 0.33	11.0
5	5.20 ± 0.25	4.8
10	9.86 ± 0.46	4.7
50	49.03 ± 0.77	1.6
100	96.51 ± 0.99	1.0
500	491.74 ± 2.15	0.4
1000	984.32 ± 14.71	1.5
3000	2923.39 ± 12.75	0.4

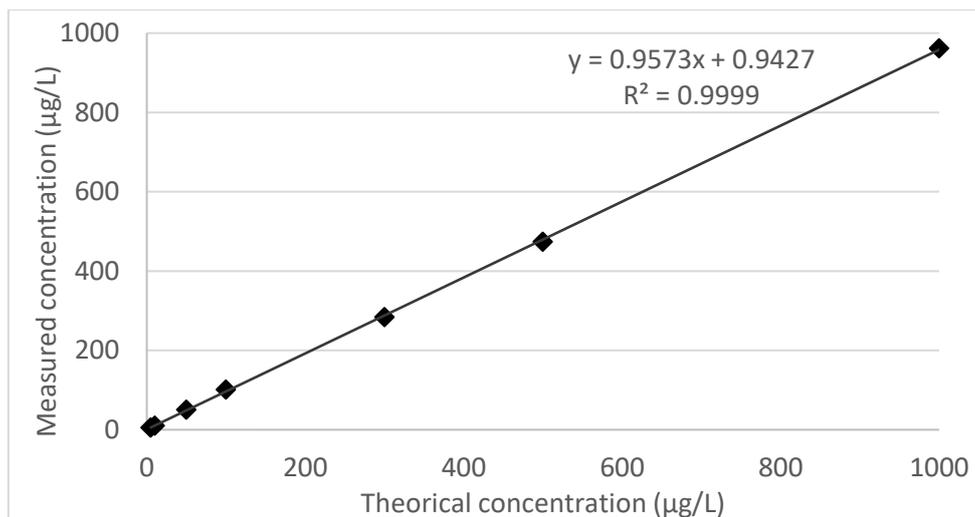


Figure S1. Typical calibration curve for ^{111}Cd obtained by analyzing in ICP-MS solutions of Cd(II) in HNO_3 2% with concentrations between 5 and 1000 $\mu\text{g/L}$.

Due to the large number of media tested and the need to assay ions all the fractions (percolation, washing and elution fractions), some extraction procedures were carried out only once. Nevertheless, this approach enabled us to obtain a trend in the behavior of the various ions as a function of the percolation media.

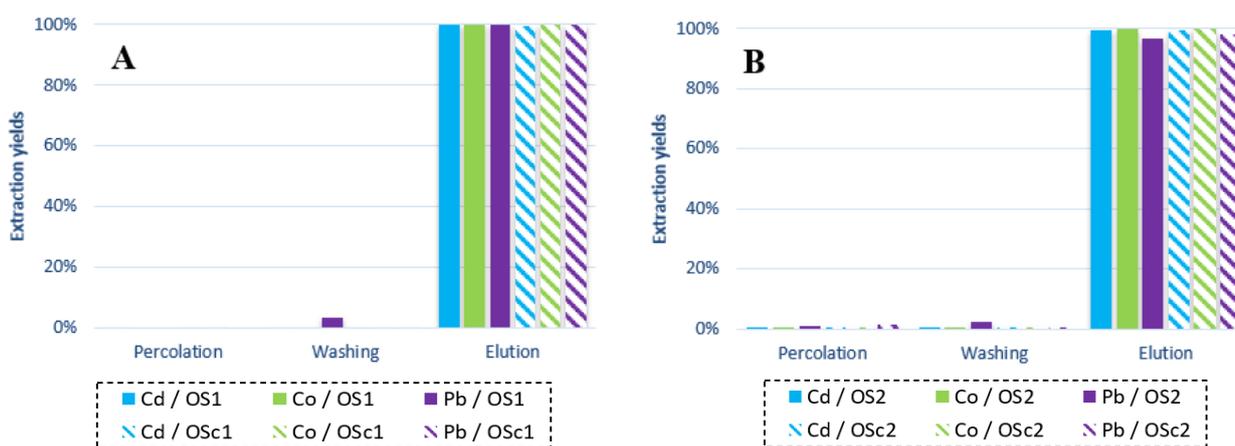


Figure S2. Extraction profiles obtained when percolating ultra-pure water spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL ultra-pure water spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 1 mL of ultra-pure water; Elution: 1 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

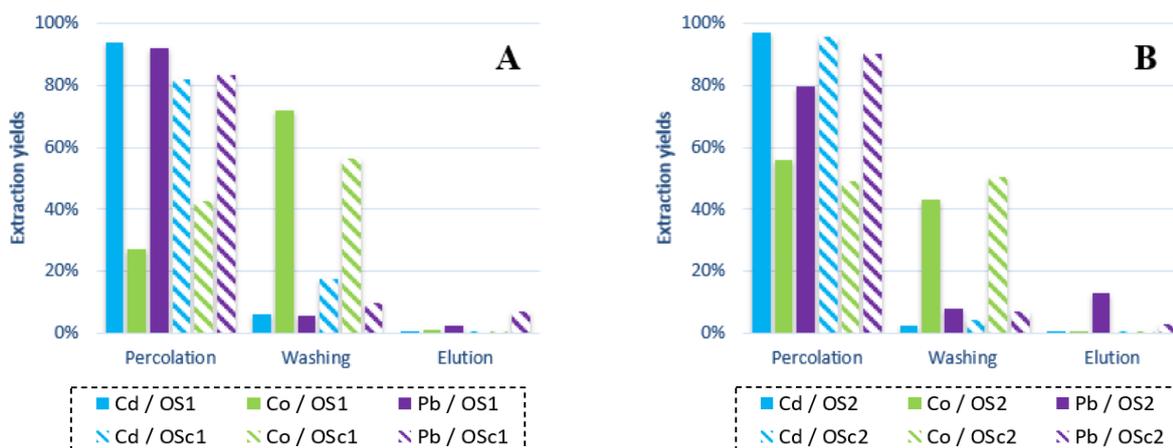


Figure S3. Extraction profiles obtained when percolating EDTA 10^{-5} M spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of EDTA 10^{-5} M spiked with 30 ng of Cd(II), Co (II) and Pb(II); Washing: 1 mL of EDTA 10^{-4} M; Elution: 500 μ L of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

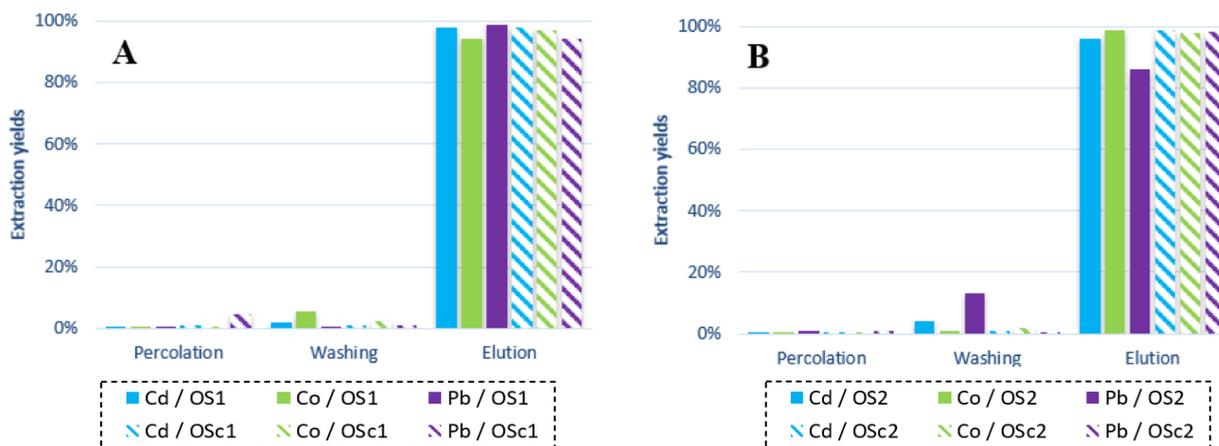


Figure S4. Extraction profiles obtained when percolating NaCl (10 mM, pH 6.0) spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of NaCl (10 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 3 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

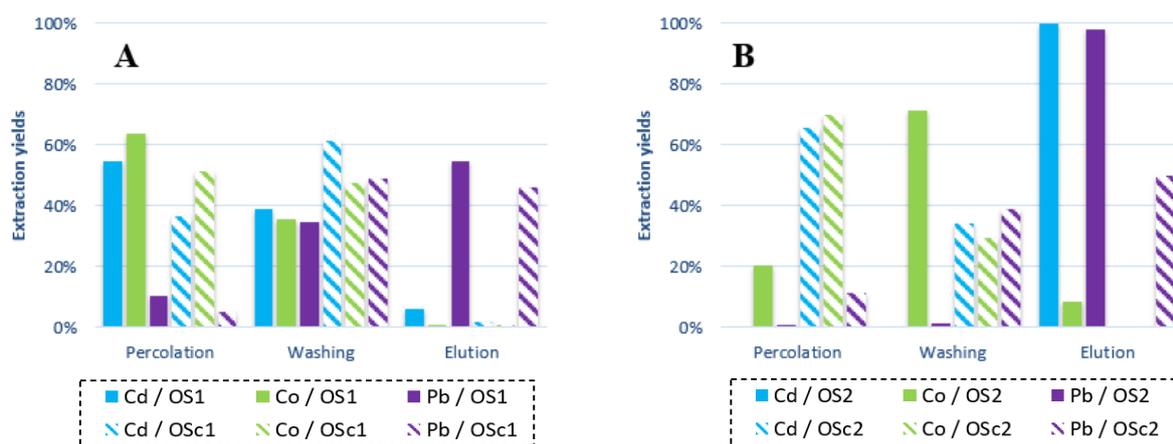


Figure S5. Extraction profiles obtained when percolating $MgCl_2$ (5 mM, pH 6.0) spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents.

SPE procedure: Percolation: 1 mL of $MgCl_2$ (5 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 1 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

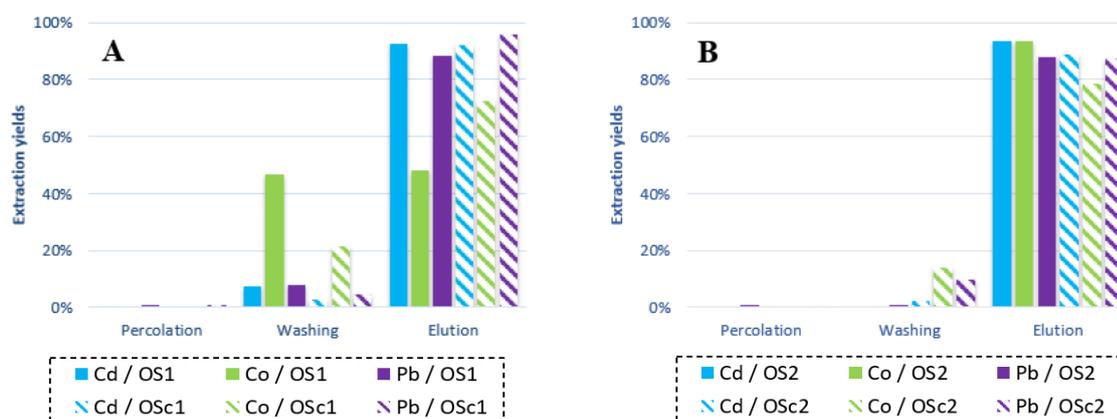


Figure S6. Extraction profiles obtained when percolating $NaNO_3$ (10 mM, pH 6.0) spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents.

SPE procedure: Percolation: 1 mL of $NaNO_3$ (10 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 1 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

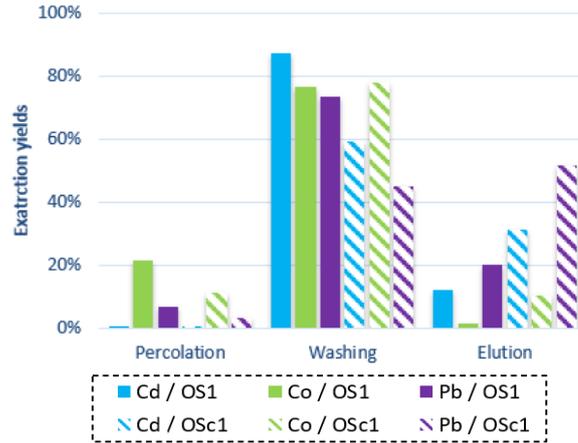


Figure S7. Extraction profiles obtained when percolating Na_2HPO_4 (100 mM, pH 7.0) spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on OS1 and on its corresponding control sorbent. SPE procedure: Percolation: 1 mL of Na_2HPO_4 100 mM mM spiked with 30 ng of Cd(II), Co (II) and Pb(II); Washing: 2 mL of the percolation buffer; Elution: 500 μL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

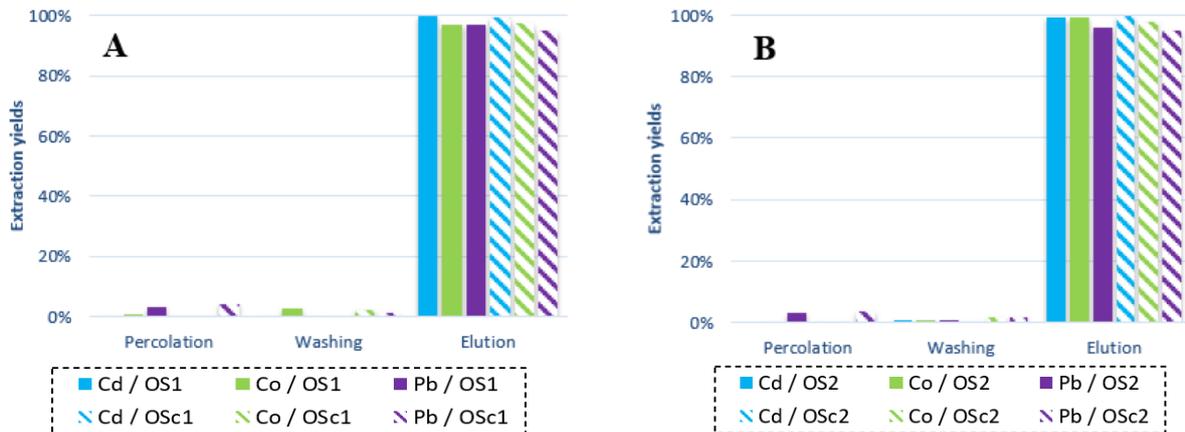


Figure S8. Extraction profiles obtained when percolating HEPES (30 mM, pH 6.5) spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of HEPES (30 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 2 mL of NaNO_3 (10 mM); Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

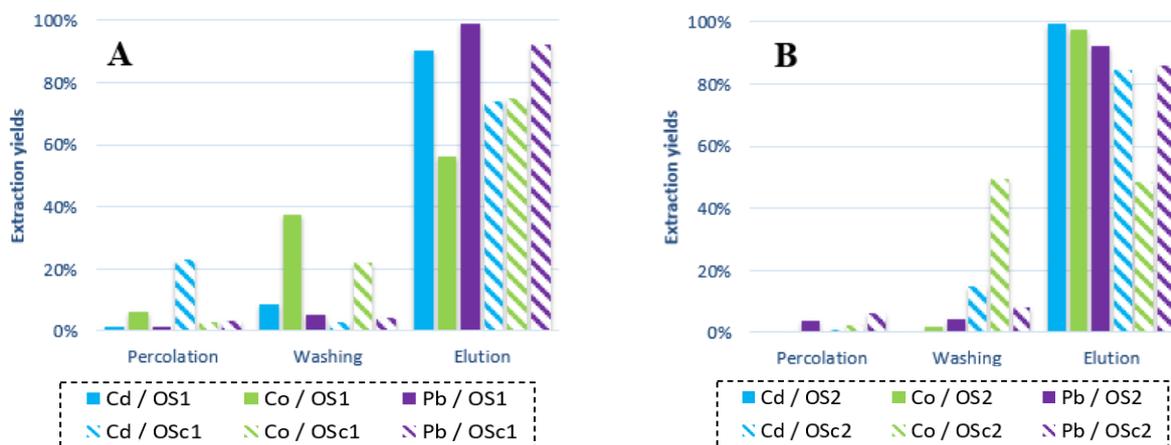


Figure S9. Extraction profiles obtained when percolating MES (50 mM, pH 6.0) spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of MES (50 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 2 mL of the percolation buffer; Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

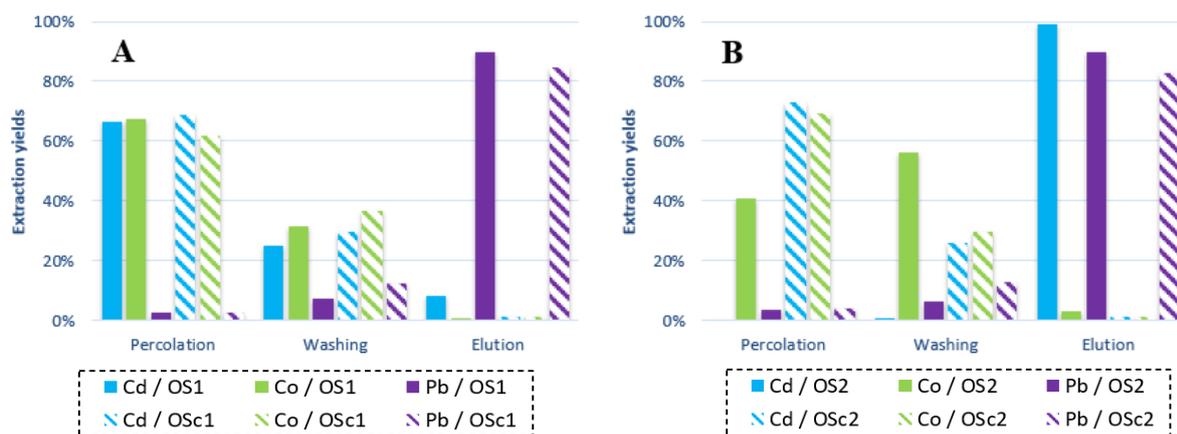


Figure S10. Extraction profiles obtained when percolating Tris-HCl (20 mM) + KCl (25 mM) + NaCl (50 mM) + MgCl₂ (5 mM), pH 7.4 spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of Tris-HCl (20 mM) + KCl (25 mM) + NaCl (50 mM) + MgCl₂ (5 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 3 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

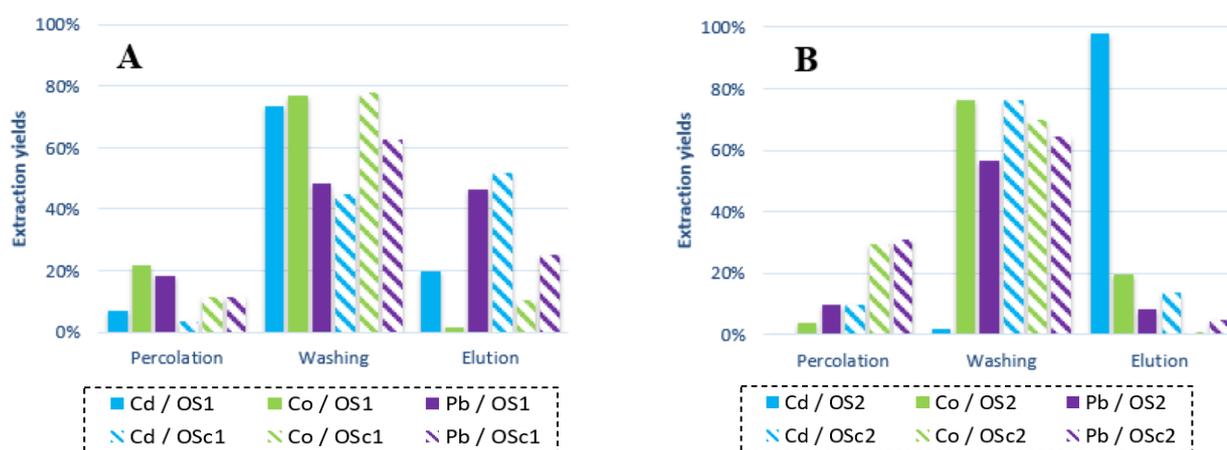


Figure S11. Extraction profiles obtained when percolating sodium acetate (10 mM) + sodium perchlorate (10 mM), pH 6.0 spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of sodium acetate (10 mM) + sodium perchlorate (10 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

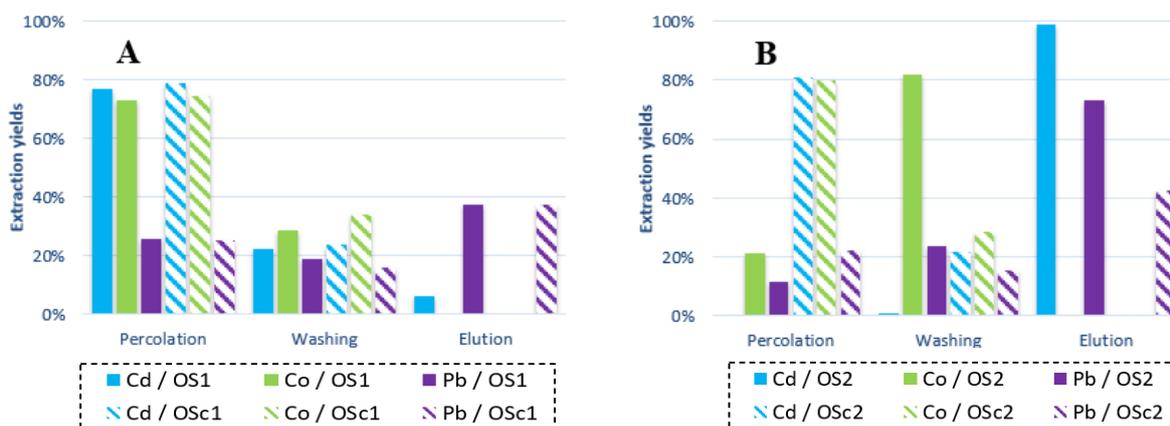


Figure S12. Extraction profiles obtained when percolating Na_2HPO_4 (10 mM) + KH_2PO_4 (1.8 mM) + NaCl (137 mM) + KCl (2.7 mM), pH 6.6 spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of Na_2HPO_4 (10 mM) + KH_2PO_4 (1.8 mM) + NaCl (137 mM) + KCl (2.7 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 4 mL of the percolation buffer; Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

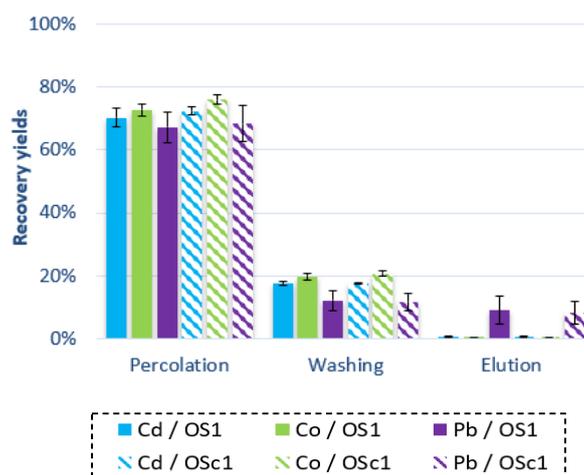


Figure S13. Extraction profiles obtained when percolating Na_2HPO_4 (25 mM) + NaH_2PO_4 (25 mM) + NaCl (150 mM), pH 6.6 spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on OS1 and on its corresponding control sorbent. SPE procedure: Percolation: 1 mL of Na_2HPO_4 (25 mM) + NaH_2PO_4 (25 mM) + NaCl (150 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 1 mL of the percolation buffer; Elution: 2 x 500 μL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

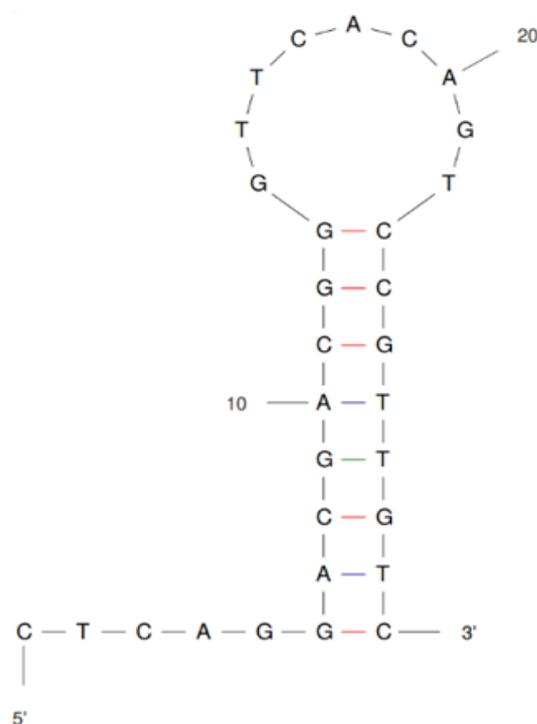


Figure S14. Secondary structure of AC2 obtained for $[\text{Mg}^{2+}] = 5$ mM, $[\text{Na}^+] = 10$ mM and $[\text{Na}^+] = 225$ mM (concentration corresponding to the optimal percolation medium PBS2) at 4°C.

Table S3. Sequences identified in the literature, interfering ions tested and interferences observed. Two Cd(II)-specific sequences have been identified in the literature: the red sequence (which composed the AC1 sequence) and the blue sequence (which composed the AC2 sequence).

Sequences	Authors	Ref	Interfering ions tested	Interfering ions observed
ATG GGT CTC ACT ATG GGA CTG TTG TGG TAT TAT TTT TGG TTG TGC AGT ATG ACT A	D. Zhou	[19]	Hg, Pb, Cd, Ag, Zn, Mn, Ni, Cu	-
GGA CTG TTG TGG TAT TAT TTT TGG TTG TGC	M. Park	[14]	Cu, Pb, Ag, Fe, Hg	Hg
GGA CTG TTG TGG TAT TAT TTT TGG TTG TGC AGT ATG	R. Y. Lai	[174]	K, Ca, Mg, Hg, Zn, Pb, Fe, Ag, Co, Cu, Mn, Cr, As, Se	-
	W. Sun	[18]	Ag, Hg, Cu, Fe, Pb, Ni, Se, Zn	Hg and Pb
GG GGA CTG TTG TGG TAT TAT TTT TGG TTG TGC AGT	Y. S. Wang	[176]	Na, Sr, Mn, K, Fe, Ca, I, Mg, Cr, Al, U, Zn, Hg, Pb, Ba, Tb, Cu, Ag	Ag
GGG GGG GGA CTG TTG TGG TAT TAT TTT TGG TTG TGC AGT	T.H. Kim	[21]	Zn, Pb, Mn, Co, Fe, Cu, Hg	Hg
A CCG ACC GTG CTG GAC TCT GGA CTG TTG TGG TAT TAT TTT TGG TTG TGC AGT ATG AGC GAG CGT TGC G	Z. Wang	[170]	Hg, Pb, Fe, Mn, Mg, K, Ag, Cu, Al, Zn, Ca	Hg
	S. Rabai	[172]	Hg, Pb, Zn	Hg
	P. Zhou	[168]	K, Ca, Mg, Hg, Zn, Pb, Fe, Ag, Co, Cu, Mn, Cr, Ba, Ni	Hg, Pb, Cu and Zn
	H. Wan	[171]	Pb, K, Cu, Ca, Mg, Na	Pb
GGG CTG GGA GGG TTG GGG TGT TGT TTT TGG TTG TGC CCT ATG	B. Zhou	[20]	K, Ag, Na, Ni, Cr, Hg, Zn, Mg, Ca, Ba	-
5'-GGG AGG GAA CTG TTG TGG TAT TAT TTT TGG TTG TGC AGT AGG GCG GG	B. Zhou	[177]	K, Na, Ba, Ca, Mn, Ni, Fe, Mg, Zn, Hg, Pb, Cu	-
AAA AAA AAA AAA AAA TTT TCG ACG GGT TCA CAG TCC GTT G	X. Yang	[179]	K, Na, Mn, Mg, Ni, Ca, Zn, Pb, Ba, Cu, Hg	Cu and Hg
CTC AGG ACG ACG GGT TCA CAG TCC GTT GTC	R. Pei	[169]	Ag, Hg, Ni, Ba, Ca, Co, Mn, Pb, Zn, Cu, Al.	Cu

Annexe 2 : Supplementary information - Chapitre IV - Article 2

$$\text{Limit of quantification} = \frac{10 \sigma}{k}$$

Equation S2. equation for calculating the limit of quantification. σ is the standard deviation in counts per second (cps) of 10 blank solutions (in 2% HNO₃) and k the sensitivity of the instrument (cps/ μ g/L)

Table S4. LOQ of ⁵⁹Co, ²⁰⁸Pb, ⁶³Cu, ⁶⁰Ni and ⁶⁶Zn in 2% HNO₃ determined by ICP-MS using Equation S1.

Element	LOQ (ng/L)
Cobalt	1
Lead	45
Copper	51
Nickel	44
Zinc	224

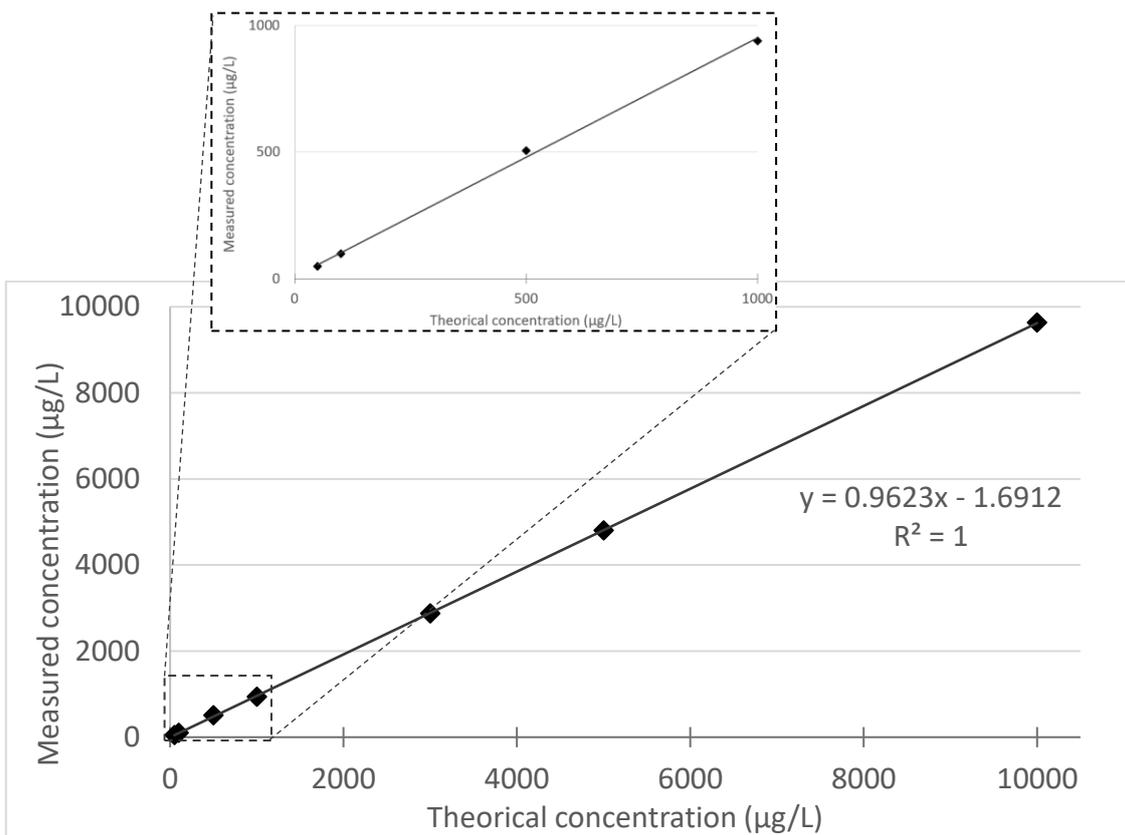


Figure S15. typical calibration curve for ^{208}Pb obtained by analyzing in ICP-MS solutions of Pb(II) in HNO_3 2% with concentrations between 50 and 10000 $\mu\text{g/L}$.

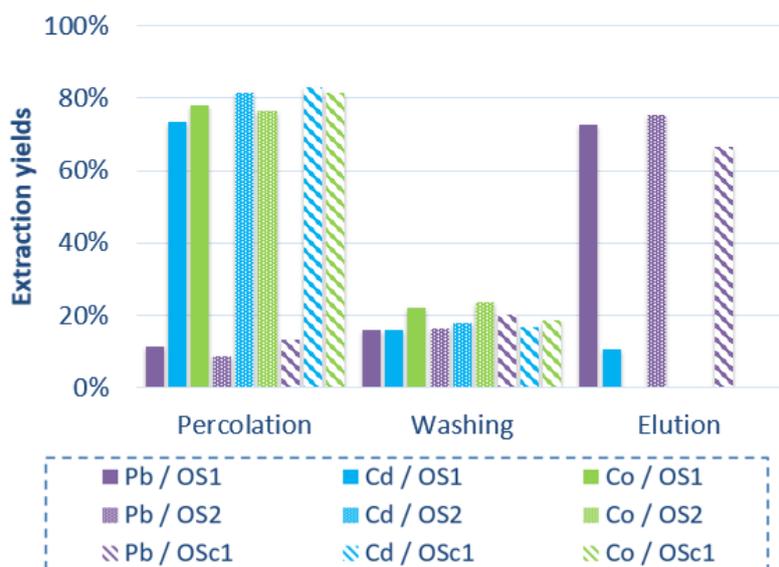


Figure S16. Extraction profiles obtained when percolating Na_2HPO_4 (10 mM) + KH_2PO_4 (1.8 mM) + NaCl (137 mM) + KCl (2.7 mM), pH 6.6 spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and OS1c1. SPE procedure: Percolation: 1 mL of Na_2HPO_4 (10 mM) + KH_2PO_4 (1.8 mM) + NaCl (137 mM) + KCl (2.7 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 4 mL of the percolation buffer; Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

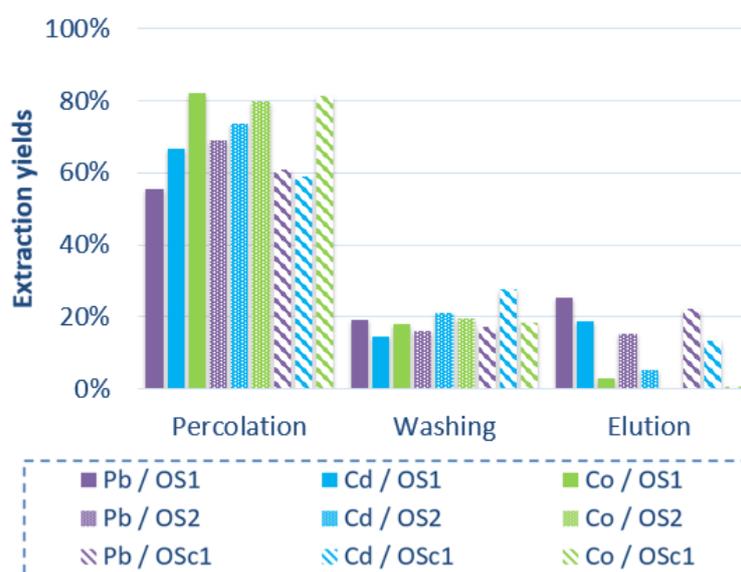


Figure S17. Extraction profiles obtained when percolating Na_2HPO_4 (25 mM) + NaH_2PO_4 (25 mM) + NaCl (150 mM), pH 6.6 spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and OS1c1. SPE procedure: Percolation: 1 mL of Na_2HPO_4 (25 mM) + NaH_2PO_4 (25 mM) + NaCl (150 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 1 mL of the percolation buffer; Elution: 2 x 1 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

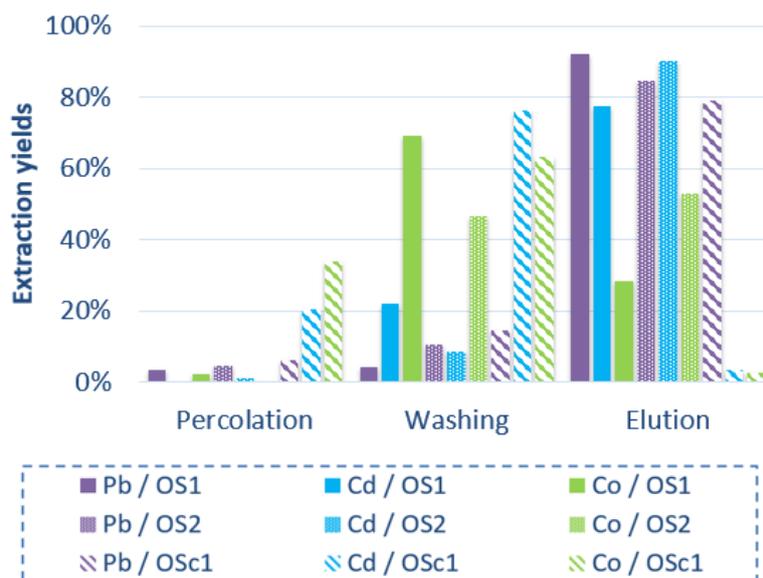


Figure S18. Extraction profiles obtained when percolating HEPES (30 mM, pH 6.5) spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and OSc1. SPE procedure: Percolation: 1 mL of HEPES (30 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 2 mL of NaNO₃ (10 mM); Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

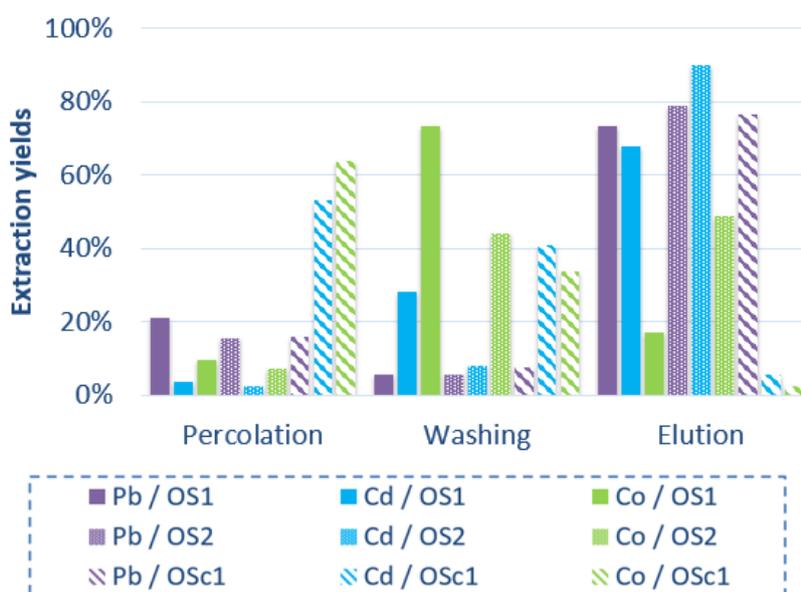


Figure S19. Extraction profiles obtained when percolating MES (50 mM, pH 6.0) spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and OSc1. SPE procedure: Percolation: 1 mL of MES (50 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 2 mL of the percolation buffer; Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

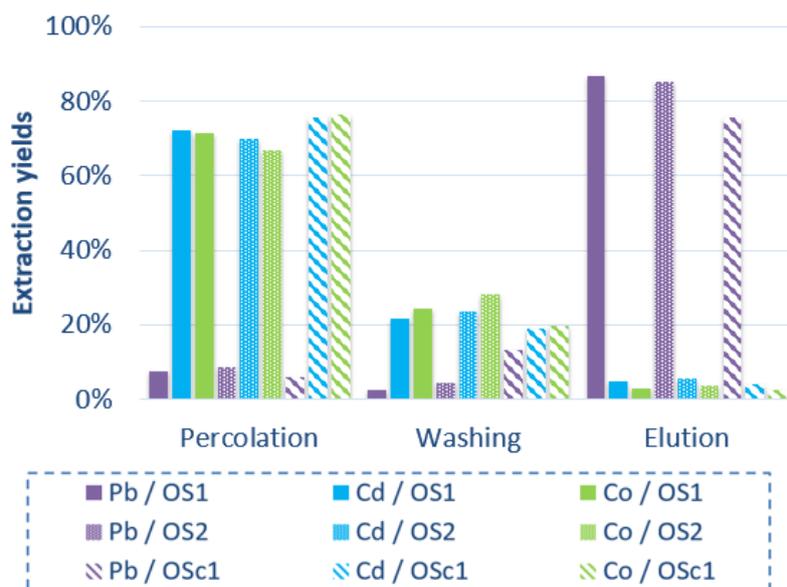


Figure S20. Extraction profiles obtained when percolating Tris-HCl (20 mM) + KCl (25 mM) + NaCl (50 mM) + MgCl₂ (5 mM), pH 7.4 spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and OSc1. SPE procedure: Percolation: 1 mL of Tris-HCl (20 mM) + KCl (25 mM) + NaCl (50 mM) + MgCl₂(5 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 3 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

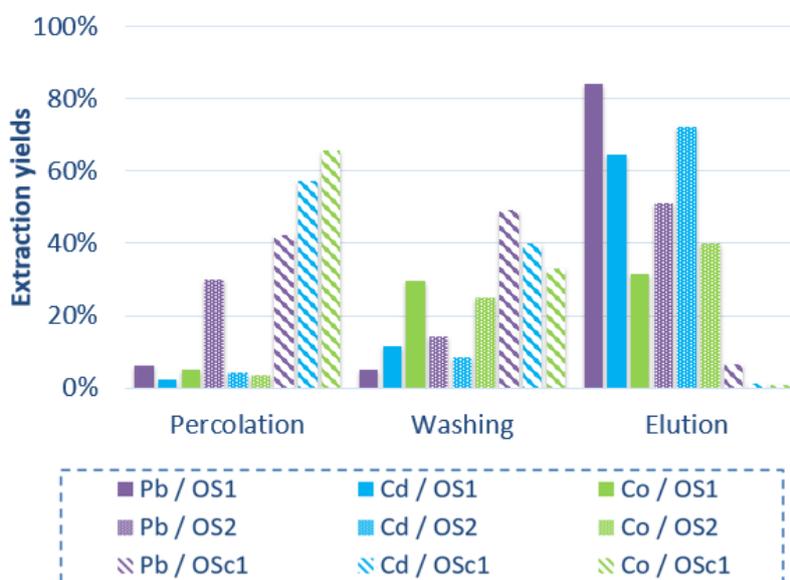


Figure S21. Extraction profiles obtained when percolating sodium acetate (10 mM) + sodium perchlorate (10 mM), pH 6.0 spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and OSc1. SPE procedure: Percolation: 1 mL CH₃COONa 10mM + NaClO₄ 10 mM, pH 6.6 spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

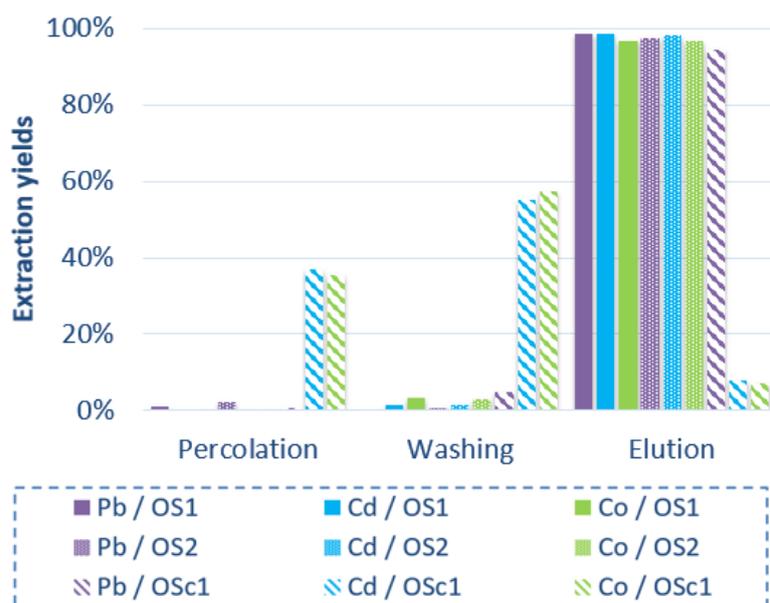


Figure S22. Extraction profiles obtained when percolating NaCl (10 mM, pH 6.0) spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and OSc1. SPE procedure: Percolation: 1 mL of NaCl (10 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 3 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

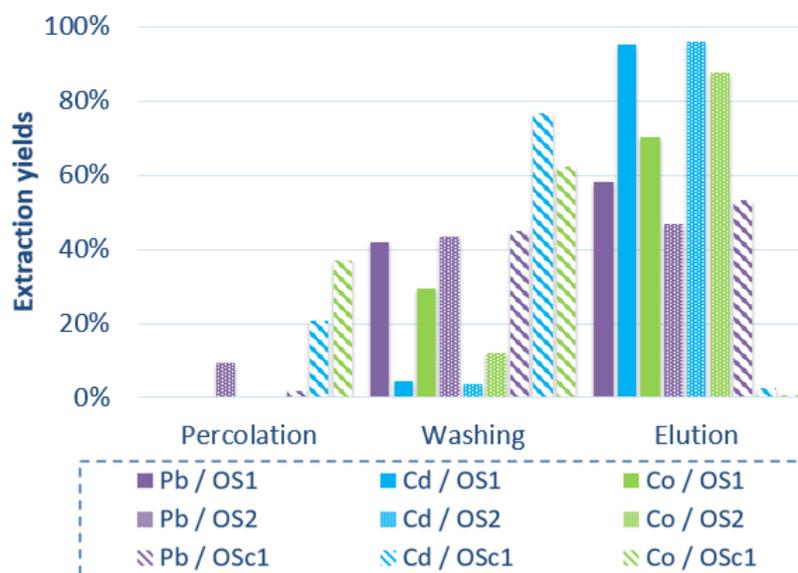


Figure S23. Extraction profiles obtained when percolating NaNO₃ (10 mM, pH 6.0) spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and OSc1. SPE procedure: Percolation: 1 mL of NaNO₃ (10 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 1 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0.

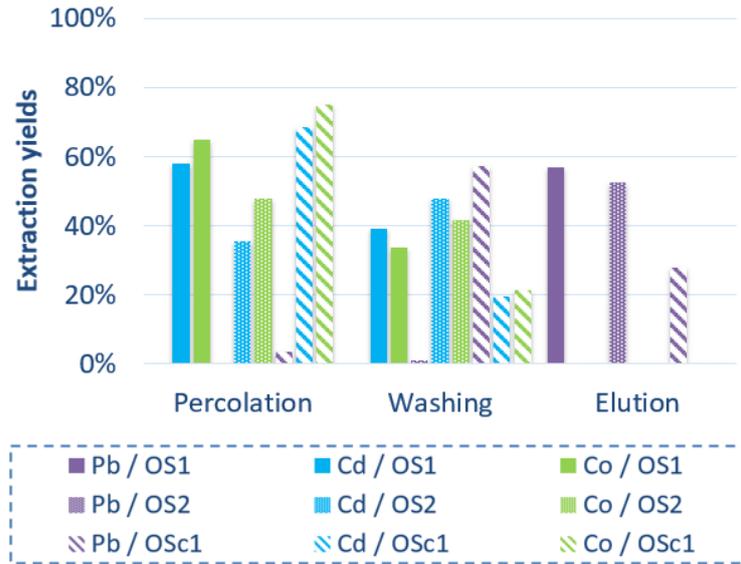


Figure S24. Extraction profiles obtained when percolating $MgCl_2$ (5 mM, pH 6.0) spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and on their control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of $MgCl_2$ (5 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 1 mL of EDTA 1 mM, pH 6.0.

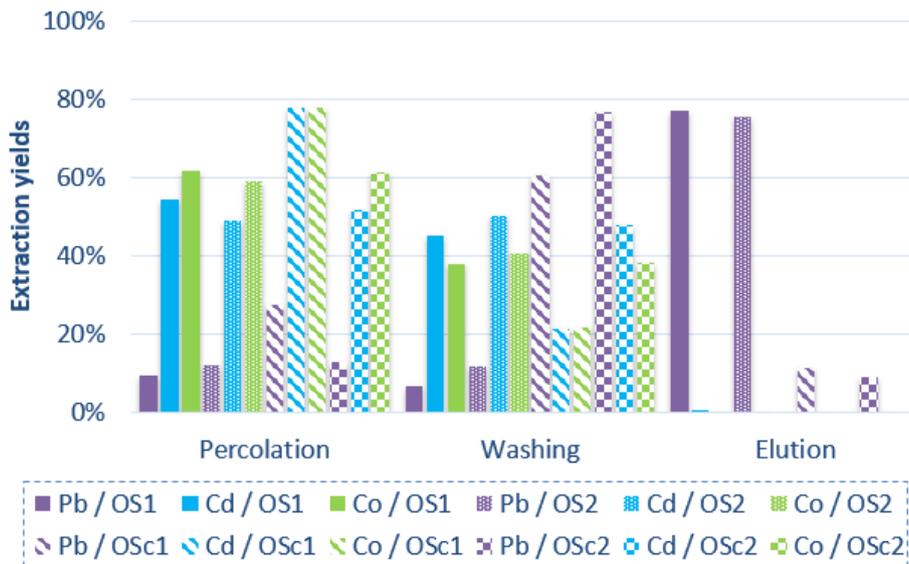


Figure S25. Extraction profiles obtained when percolating $MgCl_2$ (5 mM, pH 6.0) spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and on their control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of $MgCl_2$ (5 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 5 mL of the percolation solution; Elution: 5 mL of EDTA 1 mM, pH 6.0.

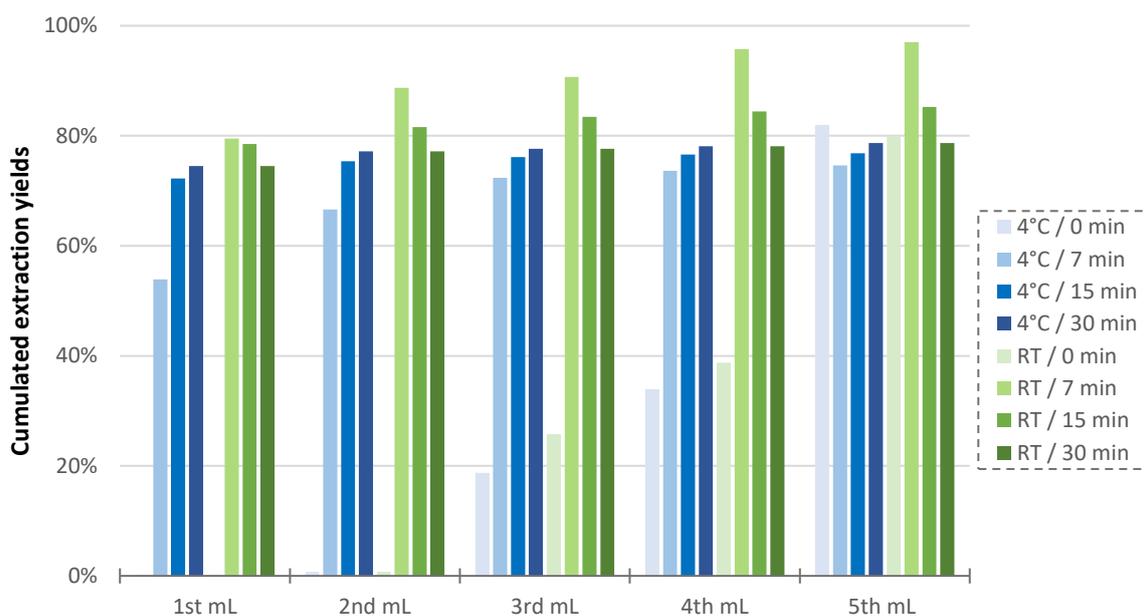


Figure S26. Cumulated extraction yields obtained in elution fractions on OS2 with a waiting time of 0, 7, 15 or 30 min for each elution fraction and an elution solution (EDTA 1 mM, pH 6.0) at 4°C (blue histograms) or at room temperature (green histograms).

Annexe 3 : Chapitre V - Gamme d'étalonnage des aptamères par chromatographie en phase liquide de paire d'ions couplée à un détecteur UV

Les gammes ci-dessous ont été obtenues après solubilisation des aptamères dans une solution de Na₂HPO₄ (200 mM) + MgCl₂ (5 mM) à pH 8.

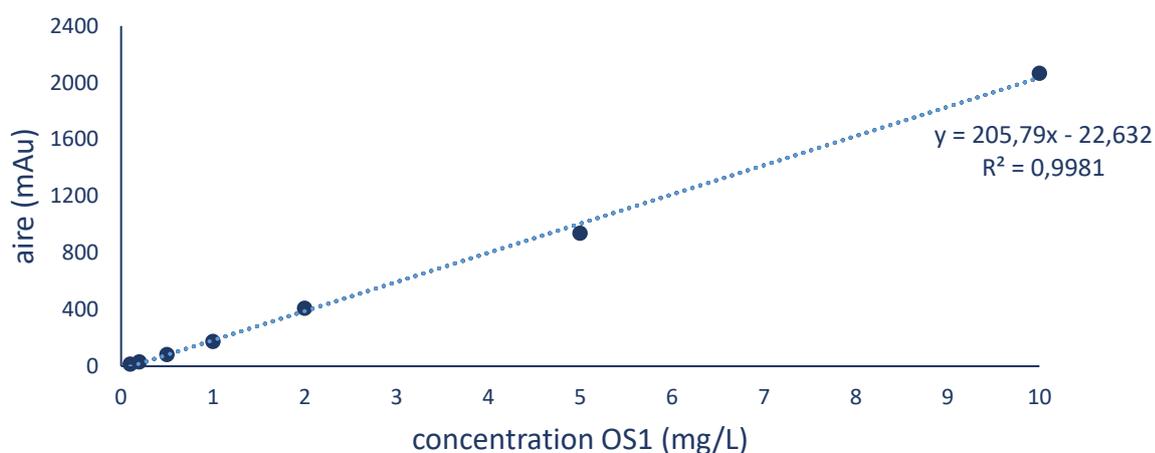


Figure S27. Courbe d'étalonnage d'OS1 de 0,1 à 10 mg/L

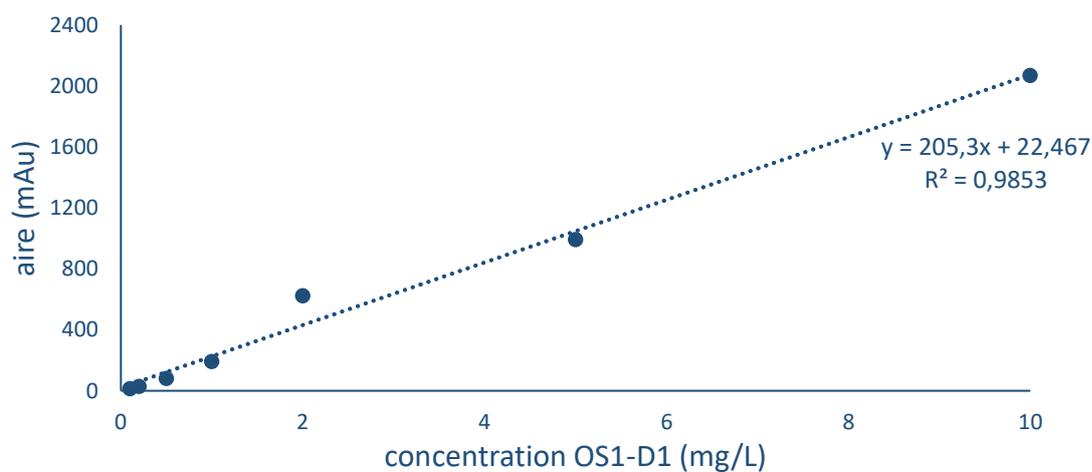


Figure S28. Courbe d'étalonnage d'OS1-D1 de 0,1 à 10 mg/L

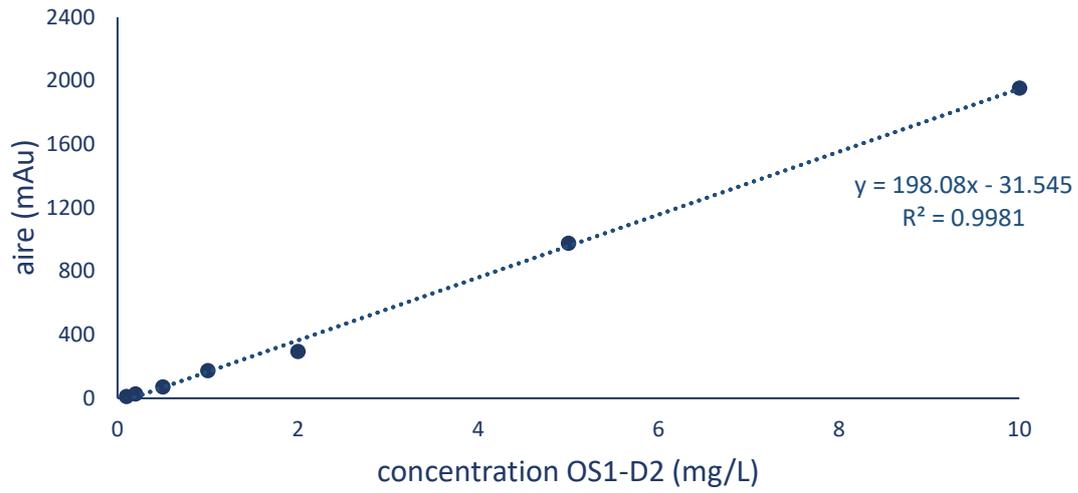


Figure S29. Courbe d'étalonnage d'OS1-D2 de 0,1 à 10 mg/L

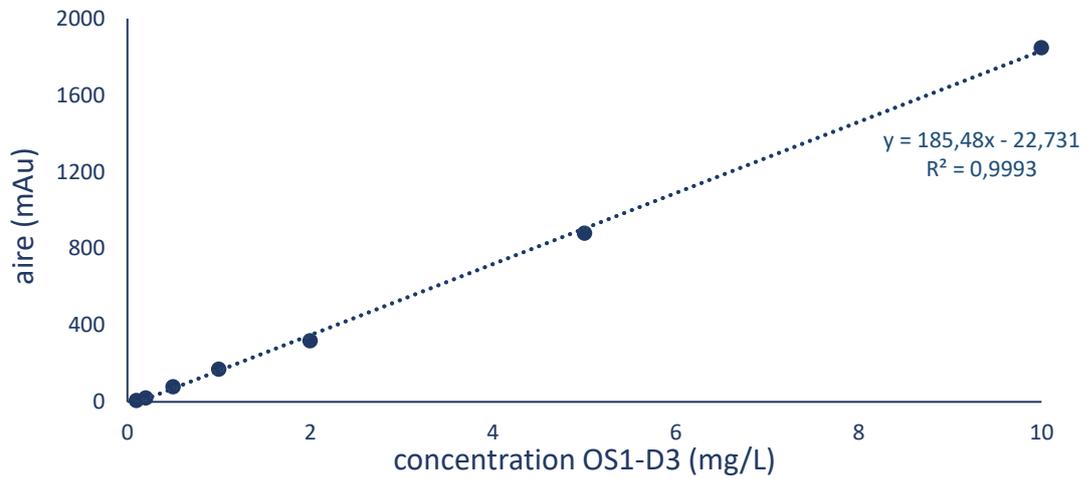


Figure S30. Courbe d'étalonnage d'OS1-D3 de 0,1 à 10 mg/L

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique d'un ICP-MS [46].....	28
Figure 2. Principales étapes de l'extraction sur phase solide	32
Figure 3. Analogie entre l'extraction sur phase solide et la chromatographie d'élution [51].	34
Figure 4. Exemple de courbe de capacité attendue lors de l'extraction en SPE d'un analyte	35
Figure 5. Structure des nanotubes de carbone [76]	40
Figure 6. Mécanisme de rétention des ions métalliques sur les MOF [81]	41
Figure 7. Synthèse d'un IIP [86].....	42
Figure 8. Profils d'extraction du Co(II), Ni(II), Zn (II) et Cu(II) sur l'IIP-1(3d) ciblant Cu(II) ainsi que sur son support contrôle NIP-1(3d). Percolation (P) : 1 mL de HNO ₃ pH 5,5 dopé à 30 µg/L avec Co(II), Ni(II), Zn(II) et Cu(II) ; lavages successifs (W) avec 1 mL de HNO ₃ pH 4 ; Elution (E) : 2 mL de HNO ₃ 5 % [88]	43
Figure 9. Structure des bases azotées constituant l'ADN et l'ARN [102].....	50
Figure 10. Formation d'une liaison phosphodiester entre deux nucléotides [104]	51
Figure 11. Appariement des paires de bases nucléotidiques par liaisons hydrogène [105] ...	51
Figure 12. Représentations schématiques des principales structures secondaires. (A) : double hélice [108] ; (B) : tige-boucle [109] ; (C) : Boucle interne [109] ; (D) : Boucles multiples [109] ; (E) : G-quadruplex [110]	52
Figure 13. Exemple d'ARN représentée en structure primaire (A), secondaire (B) ou tertiaire (C) [112].....	53
Figure 14. Représentation schématique du processus SELEX [121]	56
Figure 15. Processus de PCR symétrique et asymétrique pour une amplification d'ADN simple brin	60
Figure 16. Sélection de séquences spécifique au Cd(II) par interaction biotine-streptavidine P3 : brin complémentaire biotinylé permettant l'immobilisation de la séquence. P1 et P2 : amorce de la réaction de PCR asymétrique. [134].....	62

Figure 17. Immobilisation des séquences d'aptamères sur différents supports solides (A) Sépharose activée CNBr, (B) Sépharose activée thiol, (C) Silice activée glutaraldéhyde, (D) Agarose activée streptavidine [10]	67
Figure 18. Profils d'extraction attendus sur le support spécifique (OS) ainsi que sur le support de contrôle	72
Figure 19. Fonctionnement du capteur électrochimique en présence ou en absence d'Aflatoxine B1 appelé AFB1 [167]	74
Figure 20. Proposition de mécanisme de rétention du cadmium sur la séquence 1 [174].....	79
Figure 21. Structure G-quadruplex : (A) forme tridimensionnelle formée d'empilements de structures G-quartet (B) liaisons hydrogène formées sur un G-quartet et stabilisées par un cation [180]	86
Figure 22. Modélisation de la séquence 1 proposée par les auteurs et identification des sites de rétention [16]	93
Figure 23. Représentation schématique des modifications apportées à la séquence 1 [14,18–21,134,170–177]	100
Figure 24. Extraction profiles of Cd(II), Co(II) and Pb(II) ions in optimized media for OS1 and its control. Extraction procedure: P: 1 mL of 30 mM MES + 10 mM NaNO ₃ spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II) each; W: 4 mL of 10 mM NaNO ₃ ; E: 2 mL of 1 mM EDTA.....	113
Figure 25. Extraction profiles of Cd(II), Co(II) and Pb(II) ions percolated on OS1 and its control in (A) Na ₂ HPO ₄ 100 mM or (B) PBS2 after optimization of the whole extraction procedure (n=3). SPE procedure: (A): Percolation: 1 mL of Na ₂ HPO ₄ 100 mM spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 2 mL of the percolation solution; Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0; (B): Percolation: 1 mL of Na ₂ HPO ₄ 25 mM + NaH ₂ PO ₄ 25 mM + NaCl 150 mM (PBS2) spiked with 30 ng of Cd(II), Co (II) and Pb(II); Washing: 1 mL of PBS2; Elution: 500 µL of EDTA 1 mM.	114
Figure 26. Capacity curves obtained for Cd(II) after the percolation of an increasing amount of Cd(II) on OS2 (circle) and OS2 (triangle). The retained amount of Cd(II) corresponds to the amount found in the elution fraction after applying the optimized extraction procedure described in Figure 25B.	116
Figure 27. Extraction profiles of Cd(II) and interfering ions (Co(II), Pb(II), Mg(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II)) on OS2 (full histograms) and OS2 (hatched histograms). SPE procedure: percolation: 1 mL of Na ₂ HPO ₄ 25 mM + NaH ₂ PO ₄ 25 mM + NaCl 150 mM spiked with 15 ng of Cd(II), Co(II), Pb(II), Mg(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II); Washing: 1 mL of the percolation buffer; Elution: 500 µL of EDTA 1 mM.	117
Figure 28. Calibration curves for the analysis of Cd(II) in a human serum submitted to an acid digestion step and with (solid lines and square markers) or without (dotted lines and triangle	

markers) oligoextraction. Spiking levels are between 0 to 30 µg/L. The 95% confidence hyperbolas for the results with oligoextraction are shown as dotted lines 118

Figure 29. Extraction yields obtained in cumulated elution fractions on OS1 with a contact time of 0, 7, 15 or 30 min for each fraction of elution solution (EDTA 1 mM, pH 6.0) at 4°C (blue histograms) or at room temperature (green histograms). 140

Figure 30. Extraction profiles of Pb(II), Cd(II) and Co(II) ions percolated on OS1, OS2 and the control sorbents, OSc1 and OSc2. SPE procedure: Percolation: 1 mL of MgCl₂ 5 mM spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 5 mL of the percolation solution; Elution: 3 x 250 µL of EDTA 1 mM, Contact time of 7 min at room temperature. 141

Figure 31. Capacity curves obtained after the percolation of an increasing amount of Pb(II) on OS1 (circle), OS2 (triangle), OSc1 (Cross) and OSc2 (diamond). The retained amount of Pb(II) corresponds to the amount found in the combined elution fractions after applying the optimized procedure (see caption of Figure 30). The curves correspond to the constant yield obtained during extraction when the capacity has not been exceeded. 142

Figure 32. Extraction profiles of Pb(II) and other ions (Cd(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II)) on OS1 (full histograms), OS2 (dotted histograms), OSc1 (hatched histograms) and OSc2 (square histograms). SPE procedure: percolation: 1 mL of MgCl₂ 5 mM spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), and Zn(II); Washing: 5 mL of the percolation solution; Elution: 3 x 250 µL of EDTA 1 mM. Waiting time of 7 min at room temperature. 143

Figure 33. Calibration curves for the analysis of Pb(II) in a human serum submitted to an acid digestion step and with (solid lines and square markers) or without (dotted lines and triangle markers) oligoextraction on OS1. Spiking levels in serum are between 0 to 300 µg/L. The 95% confidence hyperbolas for the results with oligoextraction are shown as dotted lines 145

Figure 34. Modélisation des séquences sur le site mfold dans NaCl 150 mM à 25°C, avec en : (A) séquence 1 ;(B) séquence 1-D1 ;(C) séquence 1-D2 et (D) séquence 1-D3. 154

Figure 35. Profil d'extraction de Cu(II), Ni(II), Pb(II) et Cd(II) sur OS1, OS1-D1, OS1-D2 et OS1-D3 percolés dans Na₂HPO₄ 20mM + NaCl 150 mM. Procédure SPE : Percolation : 1 ml de tampon Na₂HPO₄ 20 mM + NaCl 150 mM, pH 5,5 dopé à 5 µg/L en Cu(II), Ni(II), Pb(II) et Cd(II) ; Lavage : 2 x 1 mL de tampon Na₂HPO₄ 20 mM + NaCl 150mM, pH 5,5 ; Elution : 2 x 1 mL d'EDTA 10⁻⁴ M, pH 6. 157

Figure 36. Profil d'extraction de Cu(II), Ni(II), Pb(II) et Cd(II) sur OS1 et OS1-D3 percolés dans Na₂HPO₄ 20mM + NaCl 150 mM + imidazole 0 ;1 ;10 mM. Procédure SPE : Percolation : 1 ml de tampon Na₂HPO₄ 20mM + NaCl 150 mM + imidazole 0 ; 1 ou 10 mM, pH 5,5 dopé à 5 µg/L en Cu(II), Ni(II), Pb(II) et Cd(II) ; Lavage : 2 x 1 mL de tampon 20 mM Na₂HPO₄ + 150mM NaCl + imidazole 0 ; 1 ou 2 mM, pH 5,5 ; Elution : 2 x 1 mL d'EDTA 10⁻⁴ M, pH 6. 158

Figure 37. Profil d'extraction de Cu(II) sur OS1 et OS1-D3 percolé dans Na₂HPO₄ 20mM + NaCl 150 mM + imidazole 10 mM, pH 5,5. Procédure SPE : (A) : Percolation : 1 ml de tampon Na₂HPO₄ 20mM + NaCl 150 mM + imidazole 10 mM, pH 5,5 dopé à 10 µg/L en Cu(II) ; Lavage :

2 x 1 mL de tampon 20 mM Na₂HPO₄ + 150mM NaCl + imidazole 10 mM, pH 5,5 ; Elution : 2 x 1 mL d'EDTA 10⁻³ M, pH 6. 160

Figure 38. Profil d'extraction de Cu(II) sur OS1 et OS1-D3 avec (A) l'EDTA comme éluant, (B) le BES et l'EDTA comme éluant. Procédure SPE : (A) : Percolation : 1 ml de tampon Na₂HPO₄ 20 mM + NaCl 150 mM, pH 5,5 dopé à 10µg/L en Cu(II) ; Lavage : 2 x 1 mL de tampon Na₂HPO₄ 20 mM + NaCl 150 mM, pH 5,5 ; Elution : 4 x 1 mL d'EDTA (10⁻⁵ à 10⁻⁴ M, pH 6). (B) Percolation : 1 ml de tampon Na₂HPO₄ 20 mM + NaCl 150 mM, pH 5,5 dopé à 10 µg/L en Cu(II) ; Lavage : 1 mL de tampon Na₂HPO₄ 20 mM + NaCl 150 mM, pH 5,5 ; Elution : 3 x 1 mL de BES (10⁻⁵ à 10⁻³ M) suivi de 2 x 1 mL d'EDTA 10⁻⁴ M, pH 6. 162

Figure 39. Profil d'extraction de Cu(II) sur OS1 et OSNG dans Na₂HPO₄ 20mM + NaCl 150 mM + imidazole 0 ; 1 ; 2 mM. Procédure SPE : Percolation : 1 ml de tampon Na₂HPO₄ 20 mM + NaCl 150 mM + imidazole 0 ; 1 ou 2 mM, pH 5,5 dopé à 10 µg/L en Cu(II) ; Lavage : 2 x 1 mL de tampon Na₂HPO₄ 20 mM + NaCl 150mM + imidazole 0 ; 1 ou 2 mM, pH 5,5 ; Elution : 2 x 1 mL d'EDTA 10⁻⁴ M, pH 6. 163

Figure S1. Typical calibration curve for ¹¹¹Cd obtained by analyzing in ICP-MS solutions of Cd(II) in HNO₃ 2% with concentrations between 5 and 1000 µg/L. 172

Figure S2. Extraction profiles obtained when percolating ultra-pure water spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL ultra-pure water spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 1 mL of ultra-pure water; Elution: 1 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0..... 172

Figure S3. Extraction profiles obtained when percolating EDTA 10⁻⁵ M spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of EDTA 10⁻⁵ M spiked with 30 ng of Cd(II), Co (II) and Pb(II); Washing: 1 mL of EDTA 10⁻⁴ M; Elution: 500 µL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0. ... 173

Figure S4. Extraction profiles obtained when percolating NaCl (10 mM, pH 6.0) spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of NaCl (10 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 3 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0. 173

Figure S5. Extraction profiles obtained when percolating MgCl₂ (5 mM, pH 6.0) spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of MgCl₂ (5 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 1 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0. 174

Figure S6. Extraction profiles obtained when percolating NaNO₃ (10 mM, pH 6.0) spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of NaNO₃ (10 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 1 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0..... 174

Figure S7. Extraction profiles obtained when percolating Na₂HPO₄ (100 mM, pH 7.0) spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on OS1 and on its corresponding control sorbent. SPE procedure: Percolation: 1 mL of Na₂HPO₄ 100 mM mM spiked with 30 ng of Cd(II), Co (II) and Pb(II); Washing: 2 mL of the percolation buffer; Elution: 500 µL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0. 175

Figure S8. Extraction profiles obtained when percolating HEPES (30 mM, pH 6.5) spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of HEPES (30 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 2 mL of NaNO₃ (10 mM); Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0..... 175

Figure S9. Extraction profiles obtained when percolating MES (50 mM, pH 6.0) spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of MES (50 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 2 mL of the percolation buffer; Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0..... 176

Figure S10. Extraction profiles obtained when percolating Tris-HCl (20 mM) + KCl (25 mM) + NaCl (50 mM) + MgCl₂ (5 mM), pH 7.4 spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of Tris-HCl (20 mM) + KCl (25 mM) + NaCl (50 mM) + MgCl₂(5 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 3 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0..... 176

Figure S11. Extraction profiles obtained when percolating sodium acetate (10 mM) + sodium perchlorate (10 mM), pH 6.0 spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of sodium acetate (10 mM) + sodium perchlorate (10 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0. 177

Figure S12. Extraction profiles obtained when percolating Na₂HPO₄ (10 mM) + KH₂PO₄ (1.8 mM) + NaCl (137 mM) + KCl (2.7 mM), pH 6.6 spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on (A) OS1 and (B) OS2 and on their corresponding control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of Na₂HPO₄ (10 mM) + KH₂PO₄ (1.8 mM) + NaCl (137 mM) + KCl (2.7 mM)) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 4 mL of the percolation buffer; Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0. 177

Figure S13. Extraction profiles obtained when percolating Na₂HPO₄ (25 mM) + NaH₂PO₄ (25 mM) + NaCl (150 mM), pH 6.6 spiked with Cd(II), Co(II) and Pb(II) on OS1 and on its corresponding control sorbent. SPE procedure: Percolation: 1 mL of Na₂HPO₄ (25 mM) + NaH₂PO₄ (25 mM) + NaCl (150 mM) spiked with 30 ng of Cd(II), Co(II) and Pb(II); Washing: 1 mL of the percolation buffer; Elution: 2 x 500 µL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0..... 178

Figure S14. Secondary structure of AC2 obtained for [Mg²⁺] = 5 mM, [Na⁺] = 10 mM and [Na⁺] = 225 mM (concentration corresponding to the optimal percolation medium PBS2) at 4°C. 178

Figure S15. typical calibration curve for ²⁰⁸Pb obtained by analyzing in ICP-MS solutions of Pb(II) in HNO₃ 2% with concentrations between 50 and 10000 µg/L..... 181

Figure S16. Extraction profiles obtained when percolating Na₂HPO₄ (10 mM) + KH₂PO₄ (1.8 mM) + NaCl (137 mM) + KCl (2.7 mM), pH 6.6 spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and OSc1. SPE procedure: Percolation: 1 mL of Na₂HPO₄ (10 mM) + KH₂PO₄ (1.8 mM) + NaCl (137 mM) + KCl (2.7 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 4 mL of the percolation buffer; Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0. . 182

Figure S17. Extraction profiles obtained when percolating Na₂HPO₄ (25 mM) + NaH₂PO₄ (25 mM) + NaCl (150 mM), pH 6.6 spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and OSc1. SPE procedure: Percolation: 1 mL of Na₂HPO₄ (25 mM) + NaH₂PO₄ (25 mM) + NaCl (150 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 1 mL of the percolation buffer; Elution: 2 x 1 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0. 182

Figure S18. Extraction profiles obtained when percolating HEPES (30 mM, pH 6.5) spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and OSc1. SPE procedure: Percolation: 1 mL of HEPES (30 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 2 mL of NaNO₃ (10 mM); Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0. 183

Figure S19. Extraction profiles obtained when percolating MES (50 mM, pH 6.0) spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and OSc1. SPE procedure: Percolation: 1 mL of MES (50 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 2 mL of the percolation buffer; Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0..... 183

Figure S20. Extraction profiles obtained when percolating Tris-HCl (20 mM) + KCl (25 mM) + NaCl (50 mM) + MgCl₂ (5 mM), pH 7.4 spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and OSc1. SPE procedure: Percolation: 1 mL of Tris-HCl (20 mM) + KCl (25 mM) + NaCl (50 mM) + MgCl₂(5 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 3 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0. 184

Figure S21. Extraction profiles obtained when percolating sodium acetate (10 mM) + sodium perchlorate (10 mM), pH 6.0 spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and OSc1. SPE procedure: Percolation: 1 mL CH₃COONa 10mM + NaClO₄ 10 mM, pH 6.6 spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 2 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0. 184

Figure S22. Extraction profiles obtained when percolating NaCl (10 mM, pH 6.0) spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and OSc1. SPE procedure: Percolation: 1 mL of NaCl (10 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 3 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0..... 185

Figure S23. Extraction profiles obtained when percolating NaNO₃ (10 mM, pH 6.0) spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and OSc1. SPE procedure: Percolation: 1 mL of NaNO₃ (10

mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 1 mL of EDTA 1 mM + NaCl 50 mM + Tris HCl 10 mM, pH 7.0..... 185

Figure S24. Extraction profiles obtained when percolating MgCl₂ (5 mM, pH 6.0) spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and on their control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of MgCl₂ (5 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 1 mL of the percolation solution; Elution: 1 mL of EDTA 1 mM, pH 6.0. 186

Figure S25. Extraction profiles obtained when percolating MgCl₂ (5 mM, pH 6.0) spiked with Pb(II), Cd(II) and Co(II) on OS1, OS2 and on their control sorbents. SPE procedure: Percolation: 1 mL of MgCl₂ (5 mM) spiked with 30 ng of Pb(II), Cd(II) and Co(II); Washing: 5 mL of the percolation solution; Elution: 5 mL of EDTA 1 mM, pH 6.0. 186

Figure S26. Cumulated extraction yields obtained in elution fractions on OS2 with a waiting time of 0, 7, 15 or 30 min for each elution fraction and an elution solution (EDTA 1 mM, pH 6.0) at 4°C (blue histograms) or at room temperature (green histograms). 187

Figure S27. Courbe d'étalonnage d'OS1 de 0,1 à 10 mg/L 188

Figure S28. Courbe d'étalonnage d'OS1-D1 de 0,1 à 10 mg/L 188

Figure S29. Courbe d'étalonnage d'OS1-D2 de 0,1 à 10 mg/L 189

Figure S30. Courbe d'étalonnage d'OS1-D3 de 0,1 à 10 mg/L 189

Liste des tableaux

Tableau 1. limites réglementaires et seuils de normalité pour le cadmium, le plomb et le cuivre [4,5,38]	26
Tableau 2. Comparaison des techniques spectroscopiques, issue de [49,50]	30
Tableau 3. Exemples de résines chélatantes et groupements fonctionnels associés. ND: non disponible	37
Tableau 4. Exemple de supports inorganiques modifiés par des agents de complexation. Adapté de [52].....	38
Tableau 5. Exemples de supports à base de micro-organismes, adapté de [67,68]	39
Tableau 6. Exemple d'utilisation des supports hautement spécifiques, adapté de [7–9]. Les éléments interférents retenus sur le support sont indiqués en gras. NI : non indiqué, ND : non déterminé.....	44
Tableau 7. Exemple d'aptamères identifiés pour une cible et leur constante de dissociation [101]	64
Tableau 8. Exemple de choix de supports solides et de modifications de l'aptamères afin de réaliser le greffage. Issu de [140]	66
Tableau 9. Aptamères décrits dans la littérature ayant pour cible l'ion Cd ²⁺ et utilisés dans des capteurs. Les séquences sélectionnées à l'issue du procédé SELEX sont indiquées en gras. Les éléments interférents lors de la mesure sont indiqués en gras.	76
Tableau 10. Aptamères décrits dans la bibliographie ayant pour cible l'ion Pb ²⁺ . Les séquences formant une structure G-quadruplex sont indiquées en gras. Les éléments interférents lors de la mesure sont indiqués en gras.....	82
Tableau 11. Aptamères décrits dans la bibliographie ayant pour cible l'ion Cu ²⁺ . Les séquences sélectionnées à l'issue du processus SELEX sont indiquées en gras. Les éléments interférents lors de la mesure sont indiqués en gras.....	91
Table 12. Grafting yields for each OS and the corresponding theoretical capacities of the SPE cartridge containing 30 mg of grafted Sepharose. The two values correspond, for each sorbent, to two independent immobilization procedures.	109
Table 13. Evaluation of cadmium retention during percolation, specificity (retention of Cd(II) vs. Co(II) and Pb(II) until elution on the specific OS) and selectivity (retention of Cd(II) until elution on the specific OS vs the control OS) for all the percolation media tested. The results are presented in detail in Figures S2-S13.....	111

Table 14. Grafting yields measured for each synthesized OS and their corresponding theoretical capacity values estimated for SPE cartridge containing 30 mg of grafted Sepharose.	135
Table 15. <i>Evaluation of Pb(II) retention during percolation, specificity (retention of Pb(II) vs. Cd(II) and Co(II) until elution on the specific OS) and selectivity (retention of Pb(II) until elution on the specific OS vs the control OSc1) for all the percolation media tested. The results are presented in detail in Figures S2-S10.</i>	137
Tableau 16. Séquences et informations sur les aptamères choisis	154
Tableau 17. Taux de greffage et capacité théorique pour les aptamères greffés	155
Table S1. LOQ of ⁵⁹ Co, ²⁰⁸ Pb, ⁶³ Cu, ²⁴ Mg, ⁶⁰ Ni and ⁶⁶ Zn in 2% HNO ₃ determined by ICP-MS using Equation S1.....	171
Table S2. Cd(II) concentration average, standard deviation and RSD values calculated for each calibration solution analyzed in replicate (n= 3) in 2% HNO ₃ in ICP-MS.....	171
Table S3. Sequences identified in the literature, interfering ions tested and interferences observed. Two Cd(II)-specific sequences have been identified in the literature: the red sequence (which composed the AC1 sequence) and the blue sequence (which composed the AC2 sequence).....	179
Table S4. LOQ of ⁵⁹ Co, ²⁰⁸ Pb, ⁶³ Cu, ⁶⁰ Ni and ⁶⁶ Zn in 2% HNO ₃ determined by ICP-MS using Equation S1.....	180

RÉFÉRENCES

- [1] H.-C. Kim, T.-W. Jang, H.-J. Chae, W.-J. Choi, M.-N. Ha, B.-J. Ye, B.-G. Kim, M.-J. Jeon, S.-Y. Kim, Y.-S. Hong, Evaluation and management of lead exposure, *Ann. Occup. Environ. Med.* 27 (2015) 30. <https://doi.org/10.1186/s40557-015-0085-9>.
- [2] Z.W. Myint, T.H. Oo, K.Z. Thein, A.M. Tun, H. Saeed, Copper deficiency anemia: review article, *Ann. Hematol.* 97 (2018) 1527–1534. <https://doi.org/10.1007/s00277-018-3407-5>.
- [3] J. Briffa, E. Sinagra, R. Blundell, Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans, *Heliyon.* 6 (2020) e04691. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>.
- [4] ANSES, Valeurs limites d'exposition en milieu professionnel. Évaluation des indicateurs biologiques d'exposition et recommandation de valeurs limites biologiques et de valeurs biologiques de référence pour le cadmium et ses composés. Avis de l'ANSES. Rapport d'expertise collective, Maisons-Alfort, 2018.
- [5] Arrêté du 13 juillet 2011 portant agrément d'organismes habilités à procéder au contrôle des valeurs limites biologiques fixées à l'article R. 4412-152 du code du travail pour les travailleurs exposés au plomb (dosages de plombémie), n.d.
- [6] A. Patle, R. Kurrey, M.K. Deb, T.K. Patle, D. Sinha, K. Shrivastava, Analytical approaches on some selected toxic heavy metals in the environment and their socio-environmental impacts: A meticulous review, *J. Indian Chem. Soc.* 99 (2022) 100545. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100545>.
- [7] B. Hashemi, P. Zohrabi, N. Raza, K.-H. Kim, Metal-organic frameworks as advanced sorbents for the extraction and determination of pollutants from environmental, biological, and food media, *TrAC Trends Anal. Chem.* 97 (2017) 65–82. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.08.015>.
- [8] Y. El Ouardi, A. Giove, M. Laatikainen, C. Branger, K. Laatikainen, Benefit of ion imprinting technique in solid-phase extraction of heavy metals, special focus on the last decade, *J. Environ. Chem. Eng.* 9 (2021) 106548. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106548>.
- [9] W.A. Wan Ibrahim, L.I. Abd Ali, A. Sulaiman, Mohd.M. Sanagi, H.Y. Aboul-Enein, Application of Solid-Phase Extraction for Trace Elements in Environmental and Biological Samples: A Review, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 44 (2014) 233–254. <https://doi.org/10.1080/10408347.2013.855607>.
- [10] B. Madru, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, Novel extraction supports based on immobilised aptamers: Evaluation for the selective extraction of cocaine, *Talanta.* 85 (2011) 616–624. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.04.016>.

- [11] F. Chapuis-Hugon, A. Du Boisbaudry, B. Madru, V. Pichon, New extraction sorbent based on aptamers for the determination of ochratoxin A in red wine, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 1199–1207. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4574-y>.
- [12] H.-B. Wang, L.-H. Ma, B.-Y. Fang, F. Tan, Y.-C. Cao, Y.-D. Zhao, X.-B. Hu, Visual detection of Pb²⁺ using strip biosensor based on PS2M aptamer and sensitivity enhancement probe, *Sens. Actuators B Chem.* 261 (2018) 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.01.167>.
- [13] F. Li, Y. Feng, C. Zhao, B. Tang, Crystal violet as a G-quadruplex-selective probe for sensitive amperometric sensing of lead, *Chem. Commun.* 47 (2011) 11909–11911. <https://doi.org/10.1039/C1CC15023E>.
- [14] M. Park, T.S. Seo, An integrated microfluidic device with solid-phase extraction and graphene oxide quantum dot array for highly sensitive and multiplex detection of trace metal ions, *Biosens. Bioelectron.* 126 (2019) 405–411. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.11.010>.
- [15] M. Shamsipur, L. Farzin, M. Amouzadeh Tabrizi, S. Sheibani, Functionalized Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposites with hairpin aptamers for the separation and preconcentration of trace Pb²⁺ from biological samples prior to determination by ICP MS, *Mater. Sci. Eng. C.* 77 (2017) 459–469. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.262>.
- [16] S.S. Sekhon, S.-H. Lee, K.-A. Lee, J. Min, B.-T. Lee, K.-W. Kim, J.-Y. Ahn, Y.-H. Kim, Defining the copper binding aptamotif and aptamer integrated recovery platform (AIRP), *Nanoscale.* 9 (2017) 2883–2894. <https://doi.org/10.1039/C6NR09408B>.
- [17] Z. Chen, L. Li, X. Mu, H. Zhao, L. Guo, Electrochemical aptasensor for detection of copper based on a reagentless signal-on architecture and amplification by gold nanoparticles, *Talanta.* 85 (2011) 730–735. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.04.056>.
- [18] Y. Niu, H. Xie, G. Luo, Y. Zhuang, X. Wu, G. Li, W. Sun, ZnO-reduced graphene oxide composite based photoelectrochemical aptasensor for sensitive Cd(II) detection with methylene blue as sensitizer, *Anal. Chim. Acta.* 1118 (2020) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.042>.
- [19] D. Zhou, W. Wu, Q. Li, J. Pan, J. Chen, A label-free and enzyme-free aptasensor for visual Cd²⁺ detection based on split DNAzyme fragments, *Anal. Methods.* 11 (2019) 3546–3551. <https://doi.org/10.1039/C9AY00822E>.
- [20] B. Zhou, Y.-T. Chen, X.-Y. Yang, Y.-S. Wang, X.-J. Hu, Q.-L. Suo, An Ultrasensitive Colorimetric Strategy for Detection of Cadmium Based on the Peroxidase-like Activity of G-Quadruplex-Cd(II) Specific Aptamer, *Anal. Sci.* 35 (2019) 277–282. <https://doi.org/10.2116/analsci.18P248>.
- [21] C.-S. Lee, S.H. Yu, T.H. Kim, A “turn-on” electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of Cd²⁺ using duplexed aptamer switch on electrochemically reduced

- graphene oxide electrode, *Microchem. J.* 159 (2020) 105372. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105372>.
- [22] M. Rafati-Rahimzadeh, M. Rafati-Rahimzadeh, S. Kazemi, A. Moghadamnia, Cadmium toxicity and treatment: An update, *Casp. J. Intern. Med.* 8 (2017). <https://doi.org/10.22088/cjim.8.3.135>.
- [23] J. Wang, Y. Jiang, J. Sun, J. She, M. Yin, F. Fang, T. Xiao, G. Song, J. Liu, Geochemical transfer of cadmium in river sediments near a lead-zinc smelter, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 196 (2020) 110529. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110529>.
- [24] Z. Yuan, T. Luo, X. Liu, H. Hua, Y. Zhuang, X. Zhang, L. Zhang, Y. Zhang, W. Xu, J. Ren, Tracing anthropogenic cadmium emissions: From sources to pollution, *Sci. Total Environ.* 676 (2019) 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.250>.
- [25] A. Kubier, R.T. Wilkin, T. Pichler, Cadmium in soils and groundwater: A review, *Appl. Geochem.* 108 (2019) 104388. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2019.104388>.
- [26] D. Bernhard, A. Rossmann, G. Wick, Metals in cigarette smoke, *IUBMB Life Int. Union Biochem. Mol. Biol. Life.* 57 (2005) 805–809. <https://doi.org/10.1080/15216540500459667>.
- [27] (Järup L, M. Berglund, C. Elinder, G. Nordberg, M. Vahter, Health effects of cadmium exposure -- a review of the literature and a risk estimate, *Scand. J. Work. Environ. Health.* (1998) 1–51.
- [28] P. Andujar, L. Bensefa-Colas, A. Descatha, Intoxication aiguë et chronique au cadmium, *Rev. Médecine Interne.* 31 (2010) 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2009.02.029>.
- [29] D.B. Menkes, J.P. Fawcett, Too Easily Lead? Health Effects of Gasoline Additives, *Environ. Health Perspect.* 105 (1997) 270. <https://doi.org/10.2307/3433257>.
- [30] V.M. Thomas, The Elimination of Lead in Gasoline, *Annu. Rev. Energy Environ.* 20 (1995) 301–324. <https://doi.org/10.1146/annurev.eg.20.110195.001505>.
- [31] A. Carocci, A. Catalano, G. Lauria, M.S. Sinicropi, G. Genchi, Lead Toxicity, Antioxidant Defense and Environment, in: P. De Voogt (Ed.), *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 238, Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 45–67. https://doi.org/10.1007/398_2015_5003.
- [32] R. Garnier, Toxicité du plomb et de ses dérivés, *EMC - Toxicol.-Pathol.* 2 (2005) 67–88. <https://doi.org/10.1016/j.emctp.2004.10.004>.
- [33] M. Cartwright, Le cuivre dans l'Antiquité, *Encycl. Hist. Monde.* (n.d.). <https://www.worldhistory.org/trans/fr/1-28/le-cuivre-dans-lantiquite/> (accessed July 2, 2023).

- [34] Cours du cuivre, caractéristiques et utilisation, (n.d.). <https://www.coursdesmetaux.fr/cuivre/> (accessed July 2, 2023).
- [35] US department of health and human services - ATSDR, Toxicological profile for copper, (n.d.). <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.pdf> (accessed July 2, 2023).
- [36] US department of health and human services - ATSDR, ToxGuide for copper, (n.d.). <https://www.atsdr.cdc.gov/toxguides/toxguide-132.pdf> (accessed July 2, 2023).
- [37] Maladie de Wilson. Protocole national de diagnostic de soins - centre de référence de la maladie de Wilson et autres maladies rares liées au cuivre, (n.d.). https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2021-11/pnds_wilson_texte_8nov21.pdf (accessed July 2, 2023).
- [38] Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique, n.d.
- [39] Rapport sur la maladie de Wilson - Protocole National de Diagnostic et de Soins PNDS, Haute Autorité de la Santé, 2022.
- [40] R. Michalski, Applications of Ion Chromatography for the Determination of Inorganic Cations, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39 (2009) 230–250. <https://doi.org/10.1080/10408340903032453>.
- [41] Y. Liu, J. Cheng, Elemental speciation analysis in capillary electrophoresis, *ELECTROPHORESIS*. 24 (2003) 1993–2012. <https://doi.org/10.1002/elps.200305409>.
- [42] S.K. Pandey, P. Singh, J. Singh, S. Sachan, S. Srivastava, S.K. Singh, Nanocarbon-based Electrochemical Detection of Heavy Metals, *Electroanalysis*. 28 (2016) 2472–2488. <https://doi.org/10.1002/elan.201600173>.
- [43] A. Walsh, The application of atomic absorption spectra to chemical analysis, *Spectrochim. Acta*. 7 (1955) 108–117. [https://doi.org/10.1016/0371-1951\(55\)80013-6](https://doi.org/10.1016/0371-1951(55)80013-6).
- [44] J. VANDEGANS, A.-M. DE KERSABIEC, M. HOENIG, Spectrométrie d'absorption atomique, *Tech. Ing. Tech. Anal. base documentaire : TIP630WEB*. (1997). <https://doi.org/10.51257/a-v2-p2825>.
- [45] M. Jin, H. Yuan, B. Liu, J. Peng, L. Xu, D. Yang, Review of the distribution and detection methods of heavy metals in the environment, *Anal. Methods*. 12 (2020) 5747–5766. <https://doi.org/10.1039/D0AY01577F>.
- [46] Y. Kishi, A Benchtop Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer, in: 1997. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:15620219>.

- [47] T. Wang, Liquid Chromatography–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LC–ICP–MS), *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30 (2007) 807–831. <https://doi.org/10.1080/10826070701191094>.
- [48] M. Jabłońska-Czapla, Arsenic, Antimony, Chromium, and Thallium Speciation in Water and Sediment Samples with the LC-ICP-MS Technique, *Int. J. Anal. Chem.* 2015 (2015) 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/171478>.
- [49] S. Wilschefski, M. Baxter, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects, *Clin. Biochem. Rev.* 40 (2019) 115–133. <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00024>.
- [50] G. Tyler, ICP-OES, ICP-MS and AAS Techniques Compared, Horiba group, n.d.
- [51] V. PICHON, Extraction sur phase solide pour l’analyse de composés organiques, *Tech. Ing. Tech. Anal. base documentaire : TIP630WEB.* (2006). <https://doi.org/10.51257/a-v1-p1420>.
- [52] A.R. Türker, New Sorbents for Solid-Phase Extraction for Metal Enrichment, *CLEAN – Soil Air Water.* 35 (2007) 548–557. <https://doi.org/10.1002/clen.200700130>.
- [53] H. Esmaeili, R. Foroutan, Investigation into ion exchange and adsorption methods for removing heavy metals from aqueous solutions, *Int. J. Biol. Pharm. Allied Sci.* 4 (2015) 620–629.
- [54] S. Chu, X. Feng, C. Liu, H. Wu, X. Liu, Advances in Chelating Resins for Adsorption of Heavy Metal Ions, *Ind. Eng. Chem. Res.* 61 (2022) 11309–11328. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.2c01353>.
- [55] V. Camel, Solid phase extraction of trace elements, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 58 (2003) 1177–1233. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(03\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(03)00072-7).
- [56] A. Ahmad, J.A. Siddique, M.A. Laskar, R. Kumar, S.H. Mohd-Setapar, A. Khatoon, R.A. Shiekh, New generation Amberlite XAD resin for the removal of metal ions: A review, *J. Environ. Sci.* 31 (2015) 104–123. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.12.008>.
- [57] J.-M. Chern, F.-C. Chang, Study of Nonlinear Wave Propagation Theory. III. Removing Heavy Metals from Wastewater by Ion-Exchange Process, *Sep. Sci. Technol.* 35 (2000) 1099–1116. <https://doi.org/10.1081/SS-100100214>.
- [58] M.A. Sharaf, S.A. Sayed, A.A. Younis, A.B. Farag, H.A. Arida, Removal of Trace Contaminants from Water Using New Chelating Resins, *Anal. Lett.* 40 (2007) 3443–3456. <https://doi.org/10.1080/00032710701689149>.
- [59] I. Narin, Y. Surme, E. Bercin, M. Soylak, SP70- α -benzoin oxime chelating resin for preconcentration–separation of Pb(II), Cd(II), Co(II) and Cr(III) in environmental samples, *J. Hazard. Mater.* 145 (2007) 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.11.001>.

- [60] V.N. Bulut, A. Gundogdu, C. Duran, H.B. Senturk, M. Soylak, L. Elci, M. Tufekci, A multi-element solid-phase extraction method for trace metals determination in environmental samples on Amberlite XAD-2000, *J. Hazard. Mater.* 146 (2007) 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.12.013>.
- [61] D. Rahmi, Y. Zhu, E. Fujimori, T. Umemura, H. Haraguchi, Multielement determination of trace metals in seawater by ICP-MS with aid of down-sized chelating resin-packed minicolumn for preconcentration, *Talanta*. 72 (2007) 600–606. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.11.023>.
- [62] C. Zheng, C. He, Y. Yang, T. Fujita, G. Wang, W. Yang, Characterization of Waste Amidoxime Chelating Resin and Its Reutilization Performance in Adsorption of Pb(II), Cu(II), Cd(II) and Zn(II) Ions, *Metals*. 12 (2022) 149. <https://doi.org/10.3390/met12010149>.
- [63] Y.K. Aktas, H. Ibar, Determination of Cd, Mn, Sb, Ni and Fe in water samples after preconcentration on bentonite modified with trioctyl phosphine oxide, *FRESENIUS Environ. Bull.* 16 (2007) 8–10.
- [64] M.A.A.-E. Akl, I.M. Kenawy, R.R. Lasheen, Silica Gel Modified with N-(3-Propyl)-O-phenylenediamine: Functionalization, Metal Sorption Equilibrium Studies and Application to Metal Enrichment Prior to Determination by Flame Atomic Absorption Spectrometry, *Anal. Sci.* 21 (2005) 923–931. <https://doi.org/10.2116/analsci.21.923>.
- [65] A. Mostafavi, D. Afzali, M.A. Taher, Atomic Absorption Spectrometric Determination of Trace Amounts of Copper and Zinc after Simultaneous Solid-Phase Extraction and Preconcentration onto Modified Natrolite Zeolite, *Anal. Sci.* 22 (2006) 849–853. <https://doi.org/10.2116/analsci.22.849>.
- [66] Yildiz Kalebasi Aktas, H. Ibar, Determination of chromium, copper, manganese, nickel and zinc by flame atomic absorption spectrometry after separation of bentonite modified with trioctylamine, (2005). <https://doi.org/10.5281/ZENODO.5824696>.
- [67] P.H. Pacheco, R.A. Gil, S.E. Cerutti, P. Smichowski, L.D. Martinez, Biosorption: A new rise for elemental solid phase extraction methods, *Talanta*. 85 (2011) 2290–2300. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.043>.
- [68] L. Okenicová, M. Žemberyová, S. Procházková, Biosorbents for solid-phase extraction of toxic elements in waters, *Environ. Chem. Lett.* 14 (2016) 67–77. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0539-x>.
- [69] M. Mapolelo, N. Torto, B. Prior, Evaluation of yeast strains as possible agents for trace enrichment of metal ions in aquatic environments, *Talanta*. 65 (2005) 930–937. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.08.020>.
- [70] S. Baytak, F. Zereen, Z. Arslan, Preconcentration of trace elements from water samples on a minicolumn of yeast (*Yamadazyma spartinae*) immobilized TiO₂ nanoparticles for

- determination by ICP-AES, *Talanta*. 84 (2011) 319–323. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.01.020>.
- [71] A.R. Türker, S. Baytak, Use of *Escherichia coli* Immobilized on Amberlite XAD-4 as a Solid-Phase Extractor for Metal Preconcentration and Determination by Atomic Absorption Spectrometry, *Anal. Sci.* 20 (2004) 329–334. <https://doi.org/10.2116/analsci.20.329>.
- [72] D. Mendil, M. Tuzen, C. Usta, M. Soylak, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* immobilized on Chromosorb 101: A new solid phase extractant for preconcentration of heavy metal ions in environmental samples, *J. Hazard. Mater.* 150 (2008) 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.04.116>.
- [73] M. Soylak, M. Tuzen, D. Mendil, I. Turkekul, Biosorption of heavy metals on *Aspergillus fumigatus* immobilized Diaion HP-2MG resin for their atomic absorption spectrometric determinations, *Talanta*. 70 (2006) 1129–1135. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.02.027>.
- [74] W. Li, Y. Shi, Recent advances and applications of carbon nanotubes based composites in magnetic solid-phase extraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 118 (2019) 652–665. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.039>.
- [75] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. De La Guardia, J. Namieśnik, Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media, *TrAC Trends Anal. Chem.* 77 (2016) 23–43. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.010>.
- [76] M. Lamberti, P. Pedata, N. Sannolo, S. Porto, A. De Rosa, M. Caraglia, Carbon nanotubes: Properties, biomedical applications, advantages and risks in patients and occupationally-exposed workers, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 28 (2015) 4–13. <https://doi.org/10.1177/0394632015572559>.
- [77] A. Stafiej, K. Pyrzynska, Solid phase extraction of metal ions using carbon nanotubes, *Microchem. J.* 89 (2008) 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2007.11.001>.
- [78] C.W. Abney, J.C. Gilhula, K. Lu, W. Lin, Metal-Organic Framework Templated Inorganic Sorbents for Rapid and Efficient Extraction of Heavy Metals, *Adv. Mater.* 26 (2014) 7993–7997. <https://doi.org/10.1002/adma.201403428>.
- [79] Z. Pinar Gumus, M. Soylak, Metal organic frameworks as nanomaterials for analysis of toxic metals in food and environmental applications, *TrAC Trends Anal. Chem.* 143 (2021) 116417. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116417>.
- [80] F. Nouar, G. Mouchaham, C. Serre, Metal-Organic Frameworks (MOFs) - Fabrication, propriétés et applications, *Étude Propr. Métaux.* (2021). <https://doi.org/10.51257/a-v1-m4795>.
- [81] L. Rani, J. Kaushal, A.L. Srivastav, P. Mahajan, A critical review on recent developments in MOF adsorbents for the elimination of toxic heavy metals from aqueous solutions,

- Environ. Sci. Pollut. Res. 27 (2020) 44771–44796. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10738-8>.
- [82] V. Pichon, N. Delaunay, A. Combès, Sample Preparation Using Molecularly Imprinted Polymers, *Anal. Chem.* 92 (2020) 16–33. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04816>.
- [83] G. Sharma, B. Kandasubramanian, Molecularly Imprinted Polymers for Selective Recognition and Extraction of Heavy Metal Ions and Toxic Dyes, *J. Chem. Eng. Data.* 65 (2020) 396–418. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.9b00953>.
- [84] V.V. Kusumkar, M. Galamboš, E. Viglašová, M. Daňo, J. Šmelková, Ion-Imprinted Polymers: Synthesis, Characterization, and Adsorption of Radionuclides, *Materials.* 14 (2021) 1083. <https://doi.org/10.3390/ma14051083>.
- [85] Y. El Ouardi, A. Giove, M. Laatikainen, C. Branger, K. Laatikainen, Benefit of ion imprinting technique in solid-phase extraction of heavy metals, special focus on the last decade, *J. Environ. Chem. Eng.* 9 (2021) 106548. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106548>.
- [86] P. Cao, Développement de polymères à empreintes ioniques pour la surveillance des métaux dans les eaux marines, Université Paris Sciences et Lettres, 2023.
- [87] M. Boudias, A. Gourgiotis, C. Cazala, V. Pichon, N. Delaunay, Monitoring the benefits of varying the template/monomer proportion in the synthesis of an ion-imprinted polymer for Ra(II) extraction, *Adv. Sample Prep.* 5 (2023) 100049. <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2022.100049>.
- [88] P. Cao, V. Pichon, C. Dreanno, K. Boukerma, N. Delaunay, Development of ion-imprinted polymers for the selective extraction of Cu(II) ions in environmental waters, *Talanta.* 256 (2023) 124295. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124295>.
- [89] M. Moussa, M.M. Ndiaye, T. Pinta, V. Pichon, T. Vercouter, N. Delaunay, Selective solid phase extraction of lanthanides from tap and river waters with ion imprinted polymers, *Anal. Chim. Acta.* 963 (2017) 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.012>.
- [90] M. Moussa, V. Pichon, C. Mariet, T. Vercouter, N. Delaunay, Potential of ion imprinted polymers synthesized by trapping approach for selective solid phase extraction of lanthanides, *Talanta.* 161 (2016) 459–468. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.069>.
- [91] M. Acosta, M. Savio, M.C. Talio, M.L. Ferramola, R.A. Gil, L.D. Martinez, On-line solid phase extraction of Cd from protein fractions of serum using oxidized carbon nanotubes coupled to electrothermal atomization atomic absorption spectrometry, *Microchem. J.* 110 (2013) 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.03.003>.
- [92] A.F. Barbosa, M.G. Segatelli, A.C. Pereira, A. De Santana Santos, L.T. Kubota, P.O. Luccas, C.R.T. Tarley, Solid-phase extraction system for Pb (II) ions enrichment based on

- multiwall carbon nanotubes coupled on-line to flame atomic absorption spectrometry, *Talanta*. 71 (2007) 1512–1519. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.07.026>.
- [93] S.E. Moradi, A.M. Haji Shabani, S. Dadfarnia, S. Emami, Sulfonated metal organic framework loaded on iron oxide nanoparticles as a new sorbent for the magnetic solid phase extraction of cadmium from environmental water samples, *Anal. Methods*. 8 (2016) 6337–6346. <https://doi.org/10.1039/C6AY01692H>.
- [94] Y. Wang, J. Xie, Y. Wu, X. Hu, A magnetic metal-organic framework as a new sorbent for solid-phase extraction of copper(II), and its determination by electrothermal AAS, *Microchim. Acta*. 181 (2014) 949–956. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1183-z>.
- [95] Y. Wang, H. Chen, J. Tang, G. Ye, H. Ge, X. Hu, Preparation of magnetic metal organic frameworks adsorbent modified with mercapto groups for the extraction and analysis of lead in food samples by flame atomic absorption spectrometry, *Food Chem*. 181 (2015) 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.080>.
- [96] C.R.T. Tarley, M.Z. Corazza, F.M. De Oliveira, B.F. Somera, C.C. Nascentes, M.G. Segatelli, On-line micro-solid phase preconcentration of Cd²⁺ coupled to TS-FF-AAS using a novel ion-selective bifunctional hybrid imprinted adsorbent, *Microchem. J.* 131 (2017) 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.11.013>.
- [97] V. Yilmaz, Z. Arslan, O. Hazer, H. Yilmaz, Selective solid phase extraction of copper using a new Cu(II)-imprinted polymer and determination by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES), *Microchem. J.* 114 (2014) 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.12.002>.
- [98] X. Luo, H. Yu, Y. Xi, L. Fang, L. Liu, J. Luo, Selective removal Pb(II) ions from wastewater using Pb(II) ion-imprinted polymers with bi-component polymer brushes, *RSC Adv.* 7 (2017) 25811–25820. <https://doi.org/10.1039/C7RA03536E>.
- [99] F. Du, L. Guo, Q. Qin, X. Zheng, G. Ruan, J. Li, G. Li, Recent advances in aptamer-functionalized materials in sample preparation, *TrAC Trends Anal. Chem.* 67 (2015) 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.01.007>.
- [100] M. Vergara-Barberán, M.J. Lerma-García, A. Moga, E.J. Carrasco-Correa, H. Martínez-Pérez-Cejuela, M. Beneito-Cambra, E.F. Simó-Alfonso, J.M. Herrero-Martínez, Recent advances in aptamer-based miniaturized extraction approaches in food analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 138 (2021) 116230. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116230>.
- [101] V. Pichon, F. Brothier, A. Combès, Aptamer-based-sorbents for sample treatment—a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 681–698. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8129-5>.
- [102] Nagwa, Fiche explicative de la leçon : Acides Nucléiques | Nagwa, (n.d.). <https://www.nagwa.com/fr/explainers/636128124616/> (accessed February 21, 2023).

- [103] A. Klug, The Discovery of the DNA Double Helix, *J. Mol. Biol.* 335 (2004) 3–26. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.11.015>.
- [104] Dr M.A. LAMRI 2016-2017, My Stidia. (n.d.). <https://mystidia.com/polycopie-dr-m-a-lamri-2016-2017/> (accessed February 22, 2023).
- [105] Acides nucléiques (leçon), Khan Acad. (n.d.). <https://fr.khanacademy.org/science/biologie-a-l-ecole/x5047ff3843d876a6:bio-6e-annee-sciences-de-base/x5047ff3843d876a6:bio-6-1h-adn-et-arn-les-acides-nucleiques/a/nucleic-acids> (accessed February 23, 2023).
- [106] S. Harteis, S. Schneider, Making the Bend: DNA Tertiary Structure and Protein-DNA Interactions, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 12335–12363. <https://doi.org/10.3390/ijms150712335>.
- [107] Arn.pdf, (n.d.). <https://bioc.polytechnique.fr/biocomputing/data/Arn.pdf> (accessed February 24, 2023).
- [108] 19.2: Nucleic Acid Structure, Chem. Libr. (2016). [https://chem.libretexts.org/Courses/Eastern_Mennonite_University/EMU%3A_Chemistry_for_the_Life_Sciences_\(Cessna\)/19%3A_Nucleic_Acids/19.2%3A_Nucleic_Acid_Structure](https://chem.libretexts.org/Courses/Eastern_Mennonite_University/EMU%3A_Chemistry_for_the_Life_Sciences_(Cessna)/19%3A_Nucleic_Acids/19.2%3A_Nucleic_Acid_Structure) (accessed February 23, 2023).
- [109] R. Sullivan, M.C. Adams, R.R. Naik, V.T. Milam, Analyzing Secondary Structure Patterns in DNA Aptamers Identified via CompELS, *Molecules.* 24 (2019) 1572. <https://doi.org/10.3390/molecules24081572>.
- [110] V. Viglasky, T. Hianik, Potential uses of G-quadruplex-forming aptamers, *Gen. Physiol. Biophys.* 32 (2013) 149–172. https://doi.org/10.4149/gpb_2013019.
- [111] R. Shiman, D.E. Draper, Stabilization of RNA tertiary structure by monovalent cations 1 Edited by I. Tinoco, *J. Mol. Biol.* 302 (2000) 79–91. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4031>.
- [112] N. Kim, K.N. Fuhr, T. Schlick, Graph Applications to RNA Structure and Function, in: R. Russell (Ed.), *Biophys. RNA Fold.*, Springer New York, New York, NY, 2013: pp. 23–51. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4954-6_3.
- [113] A.S.R. Potty, K. Kourentzi, H. Fang, G.W. Jackson, X. Zhang, G.B. Legge, R.C. Willson, Biophysical characterization of DNA aptamer interactions with vascular endothelial growth factor, *Biopolymers.* 91 (2009) 145–156. <https://doi.org/10.1002/bip.21097>.
- [114] P.-H. Lin, R.-H. Chen, C.-H. Lee, Y. Chang, C.-S. Chen, W.-Y. Chen, Studies of the binding mechanism between aptamers and thrombin by circular dichroism, surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 88 (2011) 552–558. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.07.032>.

- [115] P.-H. Lin, S.-L. Yen, M.-S. Lin, Y. Chang, S.R. Louis, A. Higuchi, W.-Y. Chen, Microcalorimetrics Studies of the Thermodynamics and Binding Mechanism between L-Tyrosinamide and Aptamer, *J. Phys. Chem. B.* 112 (2008) 6665–6673. <https://doi.org/10.1021/jp8000866>.
- [116] J.P. Peters, L.J. Maher, DNA curvature and flexibility *in vitro* and *in vivo*, *Q. Rev. Biophys.* 43 (2010) 23–63. <https://doi.org/10.1017/S0033583510000077>.
- [117] X. Mao, L.A. Marky, W.H. Gmeiner, NMR Structure of the Thrombin-Binding DNA Aptamer Stabilized by Sr²⁺, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 22 (2004) 25–33. <https://doi.org/10.1080/07391102.2004.10506977>.
- [118] A.D. Ellington, J.W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature.* 346 (1990) 818–822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>.
- [119] C. Tuerk, L. Gold, Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase, *Science.* 249 (1990) 505–510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>.
- [120] C. Hamula, J. Guthrie, H. Zhang, X. Li, X. Le, Selection and analytical applications of aptamers, *TrAC Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 681–691. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.05.007>.
- [121] Z. Szeitner, J. András, R.E. Gyurcsányi, T. Mészáros, Is less more? Lessons from aptamer selection strategies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 101 (2014) 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.018>.
- [122] S.E. Osborne, A.D. Ellington, Nucleic Acid Selection and the Challenge of Combinatorial Chemistry, *Chem. Rev.* 97 (1997) 349–370. <https://doi.org/10.1021/cr960009c>.
- [123] E. Luzzi, M. Minunni, S. Tombelli, M. Mascini, New trends in affinity sensing, *TrAC Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 810–818. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01208-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01208-1).
- [124] M. McKeague, E.M. McConnell, J. Cruz-Toledo, E.D. Bernard, A. Pach, E. Mastronardi, X. Zhang, M. Beking, T. Francis, A. Giamberardino, A. Cabecinha, A. Ruscito, R. Aranda-Rodriguez, M. Dumontier, M.C. DeRosa, Analysis of In Vitro Aptamer Selection Parameters, *J. Mol. Evol.* 81 (2015) 150–161. <https://doi.org/10.1007/s00239-015-9708-6>.
- [125] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 83–91. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-3388-9>.
- [126] A.D. Ellington, J.W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature.* 346 (1990) 818–822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>.
- [127] C. Zhu, L. Li, G. Yang, M. Irfan, Z. Wang, S. Fang, F. Qu, High-efficiency selection of aptamers for bovine lactoferrin by capillary electrophoresis and its aptasensor

- application in milk powder, *Talanta*. 205 (2019) 120088. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.088>.
- [128] S. Park, J.-Y. Ahn, M. Jo, D. Lee, J.T. Lis, H.G. Craighead, S. Kim, Selection and elution of aptamers using nanoporous sol-gel arrays with integrated microheaters, *Lab. Chip*. 9 (2009) 1206. <https://doi.org/10.1039/b814993c>.
- [129] Y.-J. Seo, M. Nilsen-Hamilton, H.A. Levine, A Computational Study of Alternate SELEX, *Bull. Math. Biol.* 76 (2014) 1455–1521. <https://doi.org/10.1007/s11538-014-9954-6>.
- [130] N. Pagratis, Rapid preparation of single stranded DNA from PCR products by streptavidin induced electrophoretic mobility shift, *Nucleic Acids Res.* 24 (1996) 3645–3646. <https://doi.org/10.1093/nar/24.18.3645>.
- [131] M. Kohlberger, G. Gadermaier, SELEX: Critical factors and optimization strategies for successful aptamer selection, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 69 (2022) 1771–1792. <https://doi.org/10.1002/bab.2244>.
- [132] C. Marimuthu, T.-H. Tang, J. Tominaga, S.-C. Tan, S.C.B. Gopinath, Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation, *The Analyst*. 137 (2012) 1307. <https://doi.org/10.1039/c2an15905h>.
- [133] M. Heiat, R. Ranjbar, A.M. Latifi, M.J. Rasaee, G. Farnoosh, Essential strategies to optimize asymmetric PCR conditions as a reliable method to generate large amount of ssDNA aptamers: Strategies to Optimize Asymmetric PCR, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 64 (2017) 541–548. <https://doi.org/10.1002/bab.1507>.
- [134] Y. Wu, S. Zhan, L. Wang, P. Zhou, Selection of a DNA aptamer for cadmium detection based on cationic polymer mediated aggregation of gold nanoparticles, *The Analyst*. 139 (2014) 1550–1561. <https://doi.org/10.1039/C3AN02117C>.
- [135] H. Wang, H. Cheng, J. Wang, L. Xu, H. Chen, R. Pei, Selection and characterization of DNA aptamers for the development of light-up biosensor to detect Cd(II), *Talanta*. 154 (2016) 498–503. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.005>.
- [136] Y. Chen, H. Li, T. Gao, T. Zhang, L. Xu, B. Wang, J. Wang, R. Pei, Selection of DNA aptamers for the development of light-up biosensor to detect Pb(II), *Sens. Actuators B Chem.* 254 (2018) 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.068>.
- [137] M. Zuker, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>.
- [138] N. Peyret, Prediction of nucleic acid hybridization: parameters and algorithms, 2000.
- [139] Y. Huang, J. Ryssy, M.-K. Nguyen, J. Loo, S. Hällsten, A. Kuzyk, Measuring the Affinities of RNA and DNA Aptamers with DNA Origami-Based Chiral Plasmonic Probes, *Anal. Chem.* 94 (2022) 17577–17586. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c04034>.

- [140] V. Pichon, Aptamer-based and immunosorbents, in: *Solid-Phase Extr.*, Elsevier, 2020: pp. 151–183. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816906-3.00006-6>.
- [141] E. Peyrin, Nucleic acid aptamer molecular recognition principles and application in liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1531–1536. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900061>.
- [142] C. Zeng, C. Xu, H. Tian, K. Shao, Y. Song, X. Yang, Z. Che, Y. Huang, Determination of aflatoxin B1 in *Pixian Douban* based on aptamer magnetic solid-phase extraction, *RSC Adv.* 12 (2022) 19528–19536. <https://doi.org/10.1039/D2RA02763A>.
- [143] Y. Ma, L. Hao, X. Lin, X. Liu, X. Qiu, X. Zhang, X. Hu, An in-tube aptamer/gold nanoparticles coated capillary solid-phase microextraction for separation of adenosine in serum and urine samples, *J. Chromatogr. A.* 1611 (2020) 460617. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460617>.
- [144] B. Madru, Développement d'un support d'extraction sélective à base d'aptamères : synthèse, caractérisation et application à des matrices complexes, PhD Thesis, 2010. <http://www.theses.fr/2010PA066478/document>.
- [145] H. Liu, Y. Luan, A. Lu, B. Li, M. Yang, J. Wang, An oligosorbent-based aptamer affinity column for selective extraction of aflatoxin B2 prior to HPLC with fluorometric detection, *Microchim. Acta.* 185 (2018) 71. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2591-7>.
- [146] H. Gan, H. Xu, A novel aptamer-based online magnetic solid phase extraction method for the selective determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine, *Anal. Chim. Acta.* 1008 (2018) 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.12.032>.
- [147] S.N. Aslipashaki, T. Khayamian, Z. Hashemian, Aptamer based extraction followed by electrospray ionization-ion mobility spectrometry for analysis of tetracycline in biological fluids, *J. Chromatogr. B.* 925 (2013) 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.02.018>.
- [148] R. Ahirwar, P. Nahar, Screening and Identification of a DNA Aptamer to Concanavalin A and Its Application in Food Analysis, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 4104–4111. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00784>.
- [149] I. Hmila, B. Marnissi, M. Kamali-Moghaddam, A. Ghram, Aptamer-Assisted Proximity Ligation Assay for Sensitive Detection of Infectious Bronchitis Coronavirus, *Microbiol. Spectr.* 11 (2023) e02081-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02081-22>.
- [150] M.E. Najafabadi, T. Khayamian, Z. Hashemian, Aptamer-conjugated magnetic nanoparticles for extraction of adenosine from urine followed by electrospray ion mobility spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 107 (2015) 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.021>.

- [151] D. Liu, J. Tang, H. Xu, K. Yuan, A.A. Aryee, C. Zhang, H. Meng, L. Qu, Z. Li, Split-aptamer mediated regenerable temperature-sensitive electrochemical biosensor for the detection of tumour exosomes, *Anal. Chim. Acta.* 1219 (2022) 340027. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340027>.
- [152] C. Wang, L. Liu, Q. Zhao, Low Temperature Greatly Enhancing Responses of Aptamer Electrochemical Sensor for Aflatoxin B1 Using Aptamer with Short Stem, *ACS Sens.* 5 (2020) 3246–3253. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01572>.
- [153] T. Hianik, V. Ostatná, M. Sonlajtnerova, I. Grman, Influence of ionic strength, pH and aptamer configuration for binding affinity to thrombin, *Bioelectrochemistry.* 70 (2007) 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2006.03.012>.
- [154] M. Belleperche, M. DeRosa, pH-Control in Aptamer-Based Diagnostics, Therapeutics, and Analytical Applications, *Pharmaceuticals.* 11 (2018) 80. <https://doi.org/10.3390/ph11030080>.
- [155] B. Madru, F. Chapuis-Hugon, E. Peyrin, V. Pichon, Determination of Cocaine in Human Plasma by Selective Solid-Phase Extraction Using an Aptamer-Based Sorbent, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7081–7086. <https://doi.org/10.1021/ac9006667>.
- [156] S.Y. Toh, M. Citartan, S.C.B. Gopinath, T.-H. Tang, Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay, *Biosens. Bioelectron.* 64 (2015) 392–403. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.026>.
- [157] F. Brothier, Développement d'outils bioanalytiques miniaturisés : greffage de biomolécules sur monolithes en capillaire couplés à la nanochromatographie pour l'analyse d'échantillons complexes, PhD Thesis, 2014. <http://www.theses.fr/2014PA066299/document>.
- [158] X. Yang, W. Kong, Y. Hu, M. Yang, L. Huang, M. Zhao, Z. Ouyang, Aptamer-affinity column clean-up coupled with ultra high performance liquid chromatography and fluorescence detection for the rapid determination of ochratoxin A in ginger powder, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 853–860. <https://doi.org/10.1002/jssc.201301136>.
- [159] W. Hadj Ali, V. Pichon, Characterization of oligosorbents and application to the purification of ochratoxin A from wheat extracts, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 1233–1240. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7509-6>.
- [160] T.S. Romig, C. Bell, D.W. Drolet, Aptamer affinity chromatography, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 731 (1999) 275–284. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00243-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00243-1).
- [161] G. Bayramoglu, V.C. Ozalp, U. Dincbal, M.Y. Arica, Fast and Sensitive Detection of *Salmonella* in Milk Samples Using Aptamer-Functionalized Magnetic Silica Solid Phase and MCM-41-Aptamer Gate System, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018) 1437–1444. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00018>.

- [162] H. Li, W. Ahmad, Y. Rong, Q. Chen, M. Zuo, Q. Ouyang, Z. Guo, Designing an aptamer based magnetic and upconversion nanoparticles conjugated fluorescence sensor for screening *Escherichia coli* in food, *Food Control*. 107 (2020) 106761. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106761>.
- [163] N. Deng, Z. Liang, Y. Liang, Z. Sui, L. Zhang, Q. Wu, K. Yang, L. Zhang, Y. Zhang, Aptamer Modified Organic–Inorganic Hybrid Silica Monolithic Capillary Columns for Highly Selective Recognition of Thrombin, *Anal. Chem.* 84 (2012) 10186–10190. <https://doi.org/10.1021/ac302779u>.
- [164] F. Brothier, V. Pichon, Miniaturized DNA aptamer-based monolithic sorbent for selective extraction of a target analyte coupled on-line to nanoLC, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 7875–7886. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8256-z>.
- [165] S.M. Shaban, D.-H. Kim, Recent Advances in Aptamer Sensors, *Sensors*. 21 (2021) 979. <https://doi.org/10.3390/s21030979>.
- [166] T. Tang, Y. Liu, Y. Jiang, Recent Progress on Highly Selective and Sensitive Electrochemical Aptamer-based Sensors, *Chem. Res. Chin. Univ.* 38 (2022) 866–878. <https://doi.org/10.1007/s40242-022-2084-z>.
- [167] C. Wang, Q. Zhao, A reagentless electrochemical sensor for aflatoxin B1 with sensitive signal-on responses using aptamer with methylene blue label at specific internal thymine, *Biosens. Bioelectron.* 167 (2020) 112478. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112478>.
- [168] Y. Wu, S. Zhan, L. Wang, P. Zhou, Selection of a DNA aptamer for cadmium detection based on cationic polymer mediated aggregation of gold nanoparticles, *The Analyst*. 139 (2014) 1550–1561. <https://doi.org/10.1039/C3AN02117C>.
- [169] H. Wang, H. Cheng, J. Wang, L. Xu, H. Chen, R. Pei, Selection and characterization of DNA aptamers for the development of light-up biosensor to detect Cd(II), *Talanta*. 154 (2016) 498–503. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.005>.
- [170] Z. Tao, L. Wei, S. Wu, N. Duan, X. Li, Z. Wang, A colorimetric aptamer-based method for detection of cadmium using the enhanced peroxidase-like activity of Au–MoS₂ nanocomposites, *Anal. Biochem.* 608 (2020) 113844. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113844>.
- [171] Y. Gan, T. Liang, Q. Hu, L. Zhong, X. Wang, H. Wan, P. Wang, In-situ detection of cadmium with aptamer functionalized gold nanoparticles based on smartphone-based colorimetric system, *Talanta*. 208 (2020) 120231. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120231>.
- [172] S. Rabai, M. Benounis, G. Catanante, A. Baraket, A. Errachid, N. Jaffrezic Renault, J.-L. Marty, A. Rhouati, Development of a label-free electrochemical aptasensor based on diazonium electrodeposition: Application to cadmium detection in water, *Anal. Biochem.* 612 (2021) 113956. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113956>.

- [173] L. Zeng, J. Gong, P. Rong, C. Liu, J. Chen, A portable and quantitative biosensor for cadmium detection using glucometer as the point-of-use device, *Talanta*. 198 (2019) 412–416. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.045>.
- [174] H.R. Lotfi Zadeh Zhad, Y.M. Rodríguez Torres, R.Y. Lai, A reagentless and reusable electrochemical aptamer-based sensor for rapid detection of Cd(II), *J. Electroanal. Chem.* 803 (2017) 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.09.022>.
- [175] C.T. Fakude, O.A. Arotiba, F. Arduini, N. Mabuba, Flexible Polyester Screen-printed Electrode Modified with Carbon Nanofibers for the Electrochemical Aptasensing of Cadmium (II), *Electroanalysis*. 32 (2020) 2650–2658. <https://doi.org/10.1002/elan.202060070>.
- [176] Y.-F. Zhu, Y.-S. Wang, B. Zhou, J.-H. Yu, L.-L. Peng, Y.-Q. Huang, X.-J. Li, S.-H. Chen, X. Tang, X.-F. Wang, A multifunctional fluorescent aptamer probe for highly sensitive and selective detection of cadmium(II), *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 4951–4958. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0436-1>.
- [177] B. Zhou, X.-Y. Yang, Y.-S. Wang, J.-C. Yi, Z. Zeng, H. Zhang, Y.-T. Chen, X.-J. Hu, Q.-L. Suo, Label-free fluorescent aptasensor of Cd²⁺ detection based on the conformational switching of aptamer probe and SYBR green I, *Microchem. J.* 144 (2019) 377–382. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.09.028>.
- [178] L. Xu, J. Liang, Y. Wang, S. Ren, J. Wu, H. Zhou, Z. Gao, Highly Selective, Aptamer-Based, Ultrasensitive Nanogold Colorimetric Smartphone Readout for Detection of Cd(II), *Molecules*. 24 (2019) 2745. <https://doi.org/10.3390/molecules24152745>.
- [179] Y. Xue, Y. Wang, S. Wang, M. Yan, J. Huang, X. Yang, Label-Free and Regenerable Aptasensor for Real-Time Detection of Cadmium(II) by Dual Polarization Interferometry, *Anal. Chem.* 92 (2020) 10007–10015. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01710>.
- [180] M. François, W. Leifert, R. Tellam, M. Fenech, G-quadruplexes: A possible epigenetic target for nutrition, *Mutat. Res. Mutat. Res.* 764 (2015) 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.03.003>.
- [181] F.W. Kotch, J.C. Fettinger, J.T. Davis, A Lead-Filled G-Quadruplex: Insight into the G-Quartet's Selectivity for Pb²⁺ over K⁺, *Org. Lett.* 2 (2000) 3277–3280. <https://doi.org/10.1021/ol0065120>.
- [182] Y.-K. Li, W. Li, X. Liu, T. Yang, M.-L. Chen, J.-H. Wang, Functionalized magnetic composites based on the aptamer serve as novel bio-adsorbent for the separation and preconcentration of trace lead, *Talanta*. 203 (2019) 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.075>.
- [183] Y. Zhu, G. Zeng, Y. Zhang, L. Tang, J. Chen, M. Cheng, L. Zhang, L. He, Y. Guo, X. He, M. Lai, Y. He, Highly sensitive electrochemical sensor using a MWCNTs/GNPs-modified electrode for lead (II) detection based on Pb²⁺-induced G-rich DNA conformation, *The Analyst*. 139 (2014) 5014. <https://doi.org/10.1039/C4AN00874J>.

- [184] S.M. Taghdisi, N.M. Danesh, P. Lavaee, M. Ramezani, K. Abnous, An electrochemical aptasensor based on gold nanoparticles, thionine and hairpin structure of complementary strand of aptamer for ultrasensitive detection of lead, *Sens. Actuators B Chem.* 234 (2016) 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.05.017>.
- [185] F. Gao, C. Gao, S. He, Q. Wang, A. Wu, Label-free electrochemical lead (II) aptasensor using thionine as the signaling molecule and graphene as signal-enhancing platform, *Biosens. Bioelectron.* 81 (2016) 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.096>.
- [186] W. Xu, X. Zhou, J. Gao, S. Xue, J. Zhao, Label-free and enzyme-free strategy for sensitive electrochemical lead aptasensor by using metal-organic frameworks loaded with AgPt nanoparticles as signal probes and electrocatalytic enhancers, *Electrochimica Acta.* 251 (2017) 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.08.046>.
- [187] M. Li, X. Zhou, S. Guo, N. Wu, Detection of lead (II) with a “turn-on” fluorescent biosensor based on energy transfer from CdSe/ZnS quantum dots to graphene oxide, *Biosens. Bioelectron.* 43 (2013) 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.11.039>.
- [188] Z.S. Qian, X.Y. Shan, L.J. Chai, J.R. Chen, H. Feng, A fluorescent nanosensor based on graphene quantum dots–aptamer probe and graphene oxide platform for detection of lead (II) ion, *Biosens. Bioelectron.* 68 (2015) 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.057>.
- [189] Y. Zang, J. Lei, Q. Hao, H. Ju, “Signal-On” Photoelectrochemical Sensing Strategy Based on Target-Dependent Aptamer Conformational Conversion for Selective Detection of Lead(II) Ion, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 6 (2014) 15991–15997. <https://doi.org/10.1021/am503804g>.
- [190] X.-P. Wei, F. Yang, F. Ding, J.-P. Li, An Electrochemiluminescence Biosensor for Determination of Pb²⁺ Based on G-Quadruplex of Aptamer Probe, *Chin. J. Anal. Chem.* 42 (2014) 942–947. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(14\)60750-7](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(14)60750-7).
- [191] M. Yuan, Z. Song, J. Fei, X. Wang, F. Xu, H. Cao, J. Yu, Aptasensor for lead(II) based on the use of a quartz crystal microbalance modified with gold nanoparticles, *Microchim. Acta.* 184 (2017) 1397–1403. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2135-1>.
- [192] S. Rahnema, S. Shariati, F. Divsar, Selective aptamer conjugation to silver-coated magnetite nanoparticles for magnetic solid-phase extraction of trace amounts of Pb²⁺ ions, *RSC Adv.* 11 (2021) 4971–4982. <https://doi.org/10.1039/D1RA00006C>.
- [193] D. Li, X. Yuan, C. Li, Y. Luo, Z. Jiang, A novel fluorescence aptamer biosensor for trace Pb(II) based on gold-doped carbon dots and DNAzyme synergetic catalytic amplification, *J. Lumin.* 221 (2020) 117056. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2020.117056>.
- [194] Z. Jiang, Y. Fan, A. Liang, G. Wen, Q. Liu, T. Li, Resonance Scattering Spectral Detection of Trace Pb²⁺ Using Aptamer-Modified AuPd Nanoalloy as Probe, *Plasmonics.* 5 (2010) 375–381. <https://doi.org/10.1007/s11468-010-9153-8>.

- [195] B. Gao, H. Liu, Z. Gu, An exothermic chip for point-of-care testing using a forehead thermometer as a readout, *Lab. Chip.* 16 (2016) 525–531. <https://doi.org/10.1039/C5LC01136A>.
- [196] H. Abu-Ali, A. Nabok, T.J. Smith, Development of Novel and Highly Specific ssDNA-Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Rapid Detection of Mercury (II) and Lead (II) Ions in Water, *Chemosensors.* 7 (2019) 27. <https://doi.org/10.3390/chemosensors7020027>.
- [197] S. Wang, S. Si, Aptamer biosensing platform based on carbon nanotube long-range energy transfer for sensitive, selective and multicolor fluorescent heavy metal ion analysis, *Anal. Methods.* 5 (2013) 2947. <https://doi.org/10.1039/c3ay40360b>.
- [198] M. Park, H.D. Ha, Y.T. Kim, J.H. Jung, S.-H. Kim, D.H. Kim, T.S. Seo, Combination of a Sample Pretreatment Microfluidic Device with a Photoluminescent Graphene Oxide Quantum Dot Sensor for Trace Lead Detection, *Anal. Chem.* 87 (2015) 10969–10975. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02907>.
- [199] Y. Chen, H. Li, T. Gao, T. Zhang, L. Xu, B. Wang, J. Wang, R. Pei, Selection of DNA aptamers for the development of light-up biosensor to detect Pb(II), *Sens. Actuators B Chem.* 254 (2018) 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.068>.
- [200] S.H. Yu, C.-S. Lee, T.H. Kim, Electrochemical Detection of Ultratrace Lead Ion through Attaching and Detaching DNA Aptamer from Electrochemically Reduced Graphene Oxide Electrode, *Nanomaterials.* 9 (2019) 817. <https://doi.org/10.3390/nano9060817>.
- [201] Y. Zhang, S. Xiao, H. Li, H. Liu, P. Pang, H. Wang, Z. Wu, W. Yang, A Pb²⁺-ion electrochemical biosensor based on single-stranded DNAzyme catalytic beacon, *Sens. Actuators B Chem.* 222 (2016) 1083–1089. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.08.046>.
- [202] Y. Wang, G. Zhao, G. Zhang, Y. Zhang, H. Wang, W. Cao, T. Li, Q. Wei, An electrochemical aptasensor based on gold-modified MoS₂/rGO nanocomposite and gold-palladium-modified Fe-MOFs for sensitive detection of lead ions, *Sens. Actuators B Chem.* 319 (2020) 128313. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128313>.
- [203] T. Li, E. Wang, S. Dong, Potassium–Lead-Switched G-Quadruplexes: A New Class of DNA Logic Gates, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 15082–15083. <https://doi.org/10.1021/ja9051075>.
- [204] H. Qi, X. Huang, J. Wu, J. Zhang, F. Wang, H. Qu, L. Zheng, A disposable aptasensor based on a gold-plated coplanar electrode array for on-site and real-time determination of Cu²⁺, *Anal. Chim. Acta.* 1183 (2021) 338991. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338991>.
- [205] R. Wang, Y. Cao, H. Qu, Y. Wang, L. Zheng, Label-free detection of Cu(II) in fish using a graphene field-effect transistor gated by structure-switching aptamer probes, *Talanta.* 237 (2022) 122965. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122965>.

- [206] A. Bahreyni, M. Ramezani, M. Alibolandi, P. Hassanzadeh, K. Abnous, S.M. Taghdisi, High affinity of AS1411 toward copper; its application in a sensitive aptasensor for copper detection, *Anal. Biochem.* 575 (2019) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.03.016>.
- [207] P. Joseph, Mechanisms of cadmium carcinogenesis☆, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238 (2009) 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.011>.
- [208] Y. Nzengue, R. Steiman, W. Rachidi, A. Favier, P. Guiraud, Oxidative Stress Induced by Cadmium in the C6 Cell Line: Role of Copper and Zinc, *Biol. Trace Elem. Res.* 146 (2012) 410–419. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9265-9>.
- [209] R.A. Bernhoft, Cadmium Toxicity and Treatment, *Sci. World J.* 2013 (2013) 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/394652>.
- [210] J.-M. Moulis, Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals, *BioMetals.* 23 (2010) 877–896. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9336-y>.
- [211] H. Zhang, M. Reynolds, Cadmium exposure in living organisms: A short review, *Sci. Total Environ.* 678 (2019) 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.395>.
- [212] R. Khelifi, P. Olmedo, F. Gil, B. Hammami, A. Chakroun, A. Rebai, A. Hamza-Chaffai, Arsenic, cadmium, chromium and nickel in cancerous and healthy tissues from patients with head and neck cancer, *Sci. Total Environ.* 452–453 (2013) 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.050>.
- [213] INSST, Límites de exposición profesional para agentes químicos en España, 2022.
- [214] K.L. Linge, K.E. Jarvis, Quadrupole ICP-MS: Introduction to Instrumentation, Measurement Techniques and Analytical Capabilities, *Geostand. Geoanalytical Res.* 33 (2009) 445–467. <https://doi.org/10.1111/j.1751-908X.2009.00039.x>.
- [215] M. He, L. Huang, B. Zhao, B. Chen, B. Hu, Advanced functional materials in solid phase extraction for ICP-MS determination of trace elements and their species - A review, *Anal. Chim. Acta.* 973 (2017) 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.047>.
- [216] W.C. Bauman, J. Eichhorn, Fundamental Properties of a Synthetic Cation Exchange Resin, *J. Am. Chem. Soc.* 69 (1947) 2830–2836. <https://doi.org/10.1021/ja01203a065>.
- [217] M. Darmostuk, S. Rimpelova, H. Gbelcova, T. Ruml, Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 1141–1161. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.008>.
- [218] M. Behbahani, A. Veisi, F. Omid, A. Noghrehabadi, A. Esrafil, M.H. Ebrahimi, Application of a dispersive micro-solid-phase extraction method for pre-concentration and ultra-trace determination of cadmium ions in water and biological samples, *Appl. Organomet. Chem.* 32 (2018) e4134. <https://doi.org/10.1002/aoc.4134>.

- [219] W. Bal, M. Sokołowska, E. Kurowska, P. Faller, Binding of transition metal ions to albumin: Sites, affinities and rates, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1830 (2013) 5444–5455. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.018>.
- [220] B. Billet, B. Chovelon, E. Fiore, F. Oukacine, M. Petrillo, P. Faure, C. Ravelet, E. Peyrin, Aptamer Switches Regulated by Post-Transition/Transition Metal Ions, *Angew. Chem. Int. Ed.* 60 (2021) 12346–12350. <https://doi.org/10.1002/anie.202102254>.
- [221] F. Gao, C. Gao, S. He, Q. Wang, A. Wu, Label-free electrochemical lead (II) aptasensor using thionine as the signaling molecule and graphene as signal-enhancing platform, *Biosens. Bioelectron.* 81 (2016) 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.096>.
- [222] S. Wang, S. Si, Aptamer biosensing platform based on carbon nanotube long-range energy transfer for sensitive, selective and multicolor fluorescent heavy metal ion analysis, *Anal. Methods.* 5 (2013) 2947. <https://doi.org/10.1039/c3ay40360b>.
- [223] F. Gignac, N. Delaunay, V. Pichon, Novel oligonucleotide-based sorbent for the selective extraction of cadmium from serum samples, (2023).
- [224] B. Madru, F. Chapuis-Hugon, E. Peyrin, V. Pichon, Determination of Cocaine in Human Plasma by Selective Solid-Phase Extraction Using an Aptamer-Based Sorbent, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7081–7086. <https://doi.org/10.1021/ac9006667>.
- [225] W. Liu, H. Zhu, B. Zheng, S. Cheng, Y. Fu, W. Li, T.-C. Lau, H. Liang, Kinetics and mechanism of G-quadruplex formation and conformational switch in a G-quadruplex of PS2.M induced by Pb²⁺, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 4229–4236. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1310>.
- [226] M. Guo, L. He, P.J. Strong, H. Wang, Binding between lead ions and the high-abundance serum proteins, *Chemosphere.* 112 (2014) 472–480. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.05.018>.
- [227] G. Charlot, *Les réactions chimiques en solution aqueuse et caractérisation des ions*, 7ème édition, Paris, 1983.
- [228] C.M.H. Ferreira, I.S.S. Pinto, E.V. Soares, H.M.V.M. Soares, (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions – a review, *RSC Adv.* 5 (2015) 30989–31003. <https://doi.org/10.1039/C4RA15453C>.
- [229] H. Irving, R.J.P. Williams, The stability of transition-metal complexes, *J. Chem. Soc. Resumed.* (1953) 3192. <https://doi.org/10.1039/jr9530003192>.

Abstract

Many metal ions are recognized as essential for the proper functioning of our organism, but some of them, such as cadmium or lead ions, are harmful even in trace amounts. Other ions, like copper ions, can also become harmful when a deficiency or excess is observed in the body. Standards and normal thresholds have been established, particularly in food products, as well as in biological matrices such as blood. Therefore, it is necessary to be able to quantify these trace metals in complex matrices. In order to overcome the performance limitations of elemental analysis instruments, such as lack of specificity or sensitivity to matrix effects, a preliminary sample treatment step is required, such as solid-phase extraction. However, conventional supports lack specificity, leading to the co-extraction of multiple metal ions. To overcome this lack of specificity, new highly specific supports are being developed, such as ion-imprinted polymers whose potential has already been demonstrated, but whose synthesis and implementation can be complex.

The objective of this thesis is to investigate the use of aptamers, simple DNA or RNA strands, to develop highly specific and selective extraction supports for metal ions. While their potential has already been demonstrated for the extraction of organic molecules, few studies have focused on the extraction of metal ions such as cadmium, lead, and copper, which are targeted in this study.

Following a literature review on the use of specific aptamers for these metal ions, especially in the context of sensor development, specific sequences of interest were selected for each target. These sequences were covalently attached to activated CNBr Sepharose. After evaluating the theoretical capacity of the supports by measuring the grafting rates, a detailed study of the effect of percolation and washing media on the retention of targeted ions was conducted thanks to ICP-MS measurement of each fraction, demonstrating the strong influence of ions present in the medium on specificity and selectivity. These two parameters were investigated respectively by studying the retention of other divalent cations on sorbent grafted with specific aptamers and by studying the retention of targeted ions on supports grafted with so-called control sequences, i.e. with no known affinity for targeted ions. After optimizing the procedures for each of the most promising supports capable of extracting one of the target ions, the capacities of the supports were determined. Then, the supports were successfully applied to the extraction of targeted ions from real samples such as serum, illustrating the strong potential of aptamers for the extraction of metal ions

Keywords : Aptamers, sample treatment, solid-phase extraction, ICP-MS, ions

Résumé

De nombreux ions métalliques sont reconnus comme essentiels au bon fonctionnement de notre organisme, mais certains tels que les ions cadmium ou plomb sont eux nocifs, même à l'état de traces. D'autres ions tels que les ions cuivre peuvent s'avérer nocif lorsqu'un déficit ou un excès est constaté dans l'organisme. Des normes et seuils de normalité ont donc été fixés, notamment dans les denrées alimentaires, mais aussi dans les matrices biologiques comme le sang. Il est alors nécessaire de pouvoir quantifier ces métaux à l'état de traces dans des matrices complexes. Afin de pallier les limites en termes de performances des instruments d'analyse élémentaire comme le manque de spécificité ou encore la sensibilité aux effets de matrices, une étape préalable de traitement de l'échantillon est nécessaire, telle que l'extraction sur phase solide. Cependant les supports conventionnels manquent de spécificité, entraînant la co-extraction d'autres ions. Pour combler ce manque de spécificité, de nouveaux supports hautement spécifiques sont en cours de développement, tels que les polymères à empreintes ioniques, dont le potentiel à d'ores et déjà été démontré mais dont la synthèse et la mise en œuvre peuvent s'avérer complexes.

L'objectif de cette thèse est d'investiguer l'utilisation d'aptamères, de simples brins d'ADN ou d'ARN, afin de développer des supports d'extraction hautement spécifiques et sélectifs aux ions métalliques. Si leur potentiel a déjà été démontré pour l'extraction de molécules organiques, peu de travaux concernent à ce jour l'extraction d'ions métalliques tels que ceux ciblés dans cette étude à savoir les ions cadmium, plomb et cuivre.

Après une étude bibliographique portant sur l'utilisation d'aptamères spécifiques de ces ions métalliques, notamment dans le cadre du développement de capteurs, des séquences d'intérêt ont été sélectionnées pour chacune des cibles. Ces séquences ont été greffées de manière covalente sur de la Sépharose activée CNBr. Après avoir évalué la capacité théorique des supports obtenus par la mesure des taux de greffage, une étude approfondie de l'effet des milieux de percolation et de lavage sur la rétention des ions ciblés a été réalisée grâce à la mesure de chacune des fractions en ICP-MS, démontrant la forte influence des ions présents dans le milieu sur la spécificité et la sélectivité. Ces deux paramètres ont été étudiés respectivement par l'étude de la rétention d'autres cations divalents sur les supports greffés par les aptamères spécifiques et des ions ciblés sur des supports greffés par des séquences dites de contrôle, à savoir n'ayant pas d'affinité connue pour les ions ciblés. Après optimisation des protocoles pour chacun des supports les plus prometteurs permettant d'extraire l'un des ions cibles, les capacités des supports ont été déterminées. Enfin, les supports ont permis avec succès l'extraction des ions ciblés d'échantillons réels tels que le sérum, illustrant le fort potentiel des aptamères pour l'extraction d'ions métalliques.

Mots clés : Aptamères, traitement de l'échantillon, extraction sur phase solide, ICP-MS, ions