



HAL
open science

Sélection d'aptamères anti-adénine ADN modifiés en présence de solvant organique. Application au développement de biocapteurs

Thinhinane Chaou

► **To cite this version:**

Thinhinane Chaou. Sélection d'aptamères anti-adénine ADN modifiés en présence de solvant organique. Application au développement de biocapteurs. Autre [q-bio.OT]. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0385 . tel-01674234

HAL Id: tel-01674234

<https://theses.hal.science/tel-01674234>

Submitted on 2 Jan 2018

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Interface Chimie-Biologie

Par Tinhinane Chaou

**Sélection d'aptamères anti-adénine ADN modifiés en présence de
solvant organique**

Application au développement de biocapteurs

Soutenue le 16 décembre 2015

Membres du jury :

M. Dobrijevic, Michel	Docteur.....Invité
M. Fouquet, Eric	Professeur.....Examineur
M. Azéma, Laurent	Docteur.....Examineur
M. Ducongé, Frédéric	Docteur.....Rapporteur
M. Peyrin, Eric	ProfesseurRapporteur
M. Toulmé, Jean-Jacques	Docteur.....Invité

Sélection d'aptamères anti-adénine ADN modifiés en présence de solvant organique : application au développement de biocapteurs

Résumé

Le développement d'outils de détection *in situ* (IDT) est indispensable pour rapporter en temps réel la présence d'une signature moléculaire spécifique. L'efficacité d'un IDT est liée à son affinité, à sa spécificité, mais aussi à son potentiel à opérer dans des conditions imposées par le contexte d'application. Parmi les contraintes imposées, la variation de température, le pH et la présence de solvant d'extraction. Le but du projet est de développer des aptamères capables d'opérer en présence de solvant organique ; à cet effet, nous avons opté pour une sélection en présence de méthanol. La limitation de cette stratégie est principalement liée à la nature chimique des acides nucléiques. Par conséquent, nous avons choisi d'utiliser une banque ADN incorporant le (5-(octa1,7-diynyl)-2'-deoxyuridine) dDOTP, au lieu du dTTP. Notre stratégie expérimentale a abouti à la sélection d'un aptamère qui lie spécifiquement l'adénine en présence de 25 % de méthanol. Nous avons montré que les dDOTP sont essentiels à l'interaction de l'aptamère avec l'adénine ; l'aptamère sélectionné comporte un motif riche en G partagé avec l'aptamère anti-adénosine, cependant, l'aptamère sélectionné dans le méthanol comporte un motif structural indispensable à l'interaction avec la cible en présence de méthanol. Par ailleurs, nous avons montré que l'aptamère sélectionné pourrait fonctionner comme un module de reconnaissance spécifique d'un biocapteur.

Mots clés : aptamère ; marqueurs de chimie prébiotique ; adénine ; biocapteurs ; complexe kissing ARN.

Selection of DNA modified aptamer-recognizing adenine in organic media: application to biosensor development

Abstract

Development of *in situ* detection tools (IDT) is required for specific real time monitoring of chemical species. Efficient IDT is not only related to its affinity and ability to discriminate between molecular variants, but moreover it must be adapted for operating under conditions imposed by the context of application. Among others, high temperature, pH variation and presence of organic solvents may be mentioned. The aim of our project is to develop an aptamer operating in the presence of organic solvents. For this purpose, we opted for selection in presence of methanol. Limitations of this strategy are adaptability of SELEX technology and chemical diversity of nucleic acids. For this purpose, we used library incorporating (5-(octa1,7-diynyl)-2'-deoxyuridine) dDOTP instead of conventional thymine nucleotide. Our experimental strategy led to the selection of an aptamer that specifically recognises adenine in the presence of 25 % of methanol. dDOTP nucleotides are essential for adenine recognition; the selected aptamer shares a purine rich motif with a previously described adenosine aptamer, but displays a specific structure motif, essential for operating in the presence of methanol. Furthermore, the ability of truncated variants of the selected aptamer to form a recognition module of biosensor was assessed in this study.

Keywords : aptamer ; SELEX ; prebiotic chemistry ; adenine ; biosensors ; kissing RNA complexes.

Inserm - U869 - ARNA : Régulations Naturelles et Artificielles
Université Victor Segalen, Bordeaux 2
146 rue Léo Saignat BATIMENT 3A
33076 Bordeaux cedex

Remerciements

Je remercie le professeur Eric Fouquet, le professeur Eric Peyrin, le docteur Frederic Ducongé, le docteur Michel Dobrijevic, le docteur Laurent Azéma et le docteur Jean-Jacques Toulmé, qui m'ont fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier le docteur Jean-Louis Mergny, directeur de l'unité Inserm U869, de m'avoir accueillie et de m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de son unité.

Je remercie le professeur Philippe Barthélémy de m'avoir accueillie et de m'avoir permis de participer aux discussions scientifiques au sein de son équipe.

Je voudrais remercier profondément Laetitia Evadé-Farrugia de m'avoir expliqué la méthode du SELEX, je remercie également Brune Vialet pour la synthèse des oligos et son adaptation aux contraintes spécifiques liées à mon projet.

Je tiens à remercier Emilie Daguerre pour son soutien sur le plan technique. Je remercie également Eric Dausse de m'avoir fait découvrir le monde des ARN kissing, je le remercie également pour sa contribution scientifique tout au long de ma thèse.

Je souhaite remercier le docteur Laurent Azéma de m'avoir initiée au monde de la chimie et de m'avoir formée au travail autonome.

Je remercie tous les membres de l'unité Inserm U869 qui ont contribué à rendre le travail au quotidien plus agréable, surtout Jacques Puyol et Kati Ba-Pierrozi.

Je souhaite remercier mes anciens collègues de bureau Amit Patwa, Khalid Oumzil, et Aref Hassan pour leur bonne humeur et leur soutien.

Je remercie le Centre National d'Etudes Spatiales français de m'avoir donné la chance de réaliser mon projet de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à ma famille, qui m'a aidée et encouragée tout au long de mon parcours.

Table des matières

Résumé.....	2
Abstract.....	3
Liste des abréviations.....	9
I. Introduction générale.....	12
1. Préambule.....	13
2. L'émergence de l'idée d'évolution à l'échelle moléculaire.....	15
2.1 Sélection basée sur des matrices ARN naturels.....	16
a) La catalyse.....	16
b) La reconnaissance moléculaire.....	18
2.2 Sélection basée sur des matrices ARN complètement aléatoires.....	19
3. L'application de la sélection <i>in vitro</i> en biotechnologie.....	21
4. Amélioration et adaptation de la sélection <i>in vitro</i>	22
4.1 La diversité.....	22
4.1.1 Conception de la banque.....	23
A) Répartition aléatoire complète.....	23
B) Répartition aléatoire partielle.....	23
C) Répartition aléatoire segmentaire.....	23
D) Limite de la répartition aléatoire.....	24
4.1.2 Chimie de la banque.....	24
4.1.2.1 Modification au niveau du sucre.....	25
A) Substitution de la position 2'-OH du ribose.....	25
B) Substitution totale du ribose par un autre analogue.....	26
4.1.2.2 Modification sur les ponts phosphodiesters.....	27
4.1.2.3 Substitution au niveau des bases azotées (pyrimidines).....	28
4.1.2.4 Autres approches SELEX basées sur des modifications de la banque.....	31
A) Photo-SELEX.....	31
B) Blended-SELEX.....	32
C) La technologie Spiegelmer.....	32
4.2 La sélection.....	33
4.2.1 Modifications basées sur la stratégie expérimentale adoptée.....	34
A) La sélection négative (Negative-SELEX).....	34
B) Le contre-SELEX.....	34

4. 2. 2 Adaptation des technologies à la méthode SELEX	34
Exemple 1) : l'électrophorèse capillaire.....	34
Exemple 2) : Le MonoLEX	35
5. La réplication (amplification)	36
6. Exemple d'application d'aptamères : développement de biocapteurs	37
6. 1 Introduction	37
6. 2 Développement de biocapteur à partir d'aptamères.....	39
6. 3 Conception rationnelle : modification post SELEX	39
A) Les systèmes monomères	39
B) Conception de biocapteurs multi-mères.....	41
C) Les systèmes chimériques	44
C1) Développement d'aptamères comme module de signalisation ...	44
C2) Développement d'aptamères comme module de transduction de signal	46
C3) Le développement d'aptamère comme module de transduction spécifique	46
II. Présentation et objectifs de la thèse	50
1. Contexte de l'étude	51
1. 1 Application des biopuces à la détection sous des contraintes spatiales	51
2. But du projet de thèse	53
2. 1 Limitation d'utilisation des aptamères en présence de solvants d'extraction	54
III. Résultats.....	56
1. Stratégie expérimentale	57
1. 1 La diversité : Introduction de nucléotides modifiés.....	57
1. 2 Amplification : choix de l'enzyme adaptée à l'incorporation du nucléotide modifié	58
1. 3 La sélection	62
1. 3. 1 Immobilisation de l'adénine à la surface des billes magnétiques	63
A) Choix de la position de substitution sur la molécule d'adénine ...	63
B) Choix du support.....	63
C) Choix du lien	64
1. 3. 2 Stratégie expérimentale	64
A) synthèse de billes de sélection	64
B) Synthèse de billes de contre-sélection	64
C) Etude de la qualité des supports solide.....	66
1. 4 Description des Méthodes d'évaluation post-SELEX	68
1. 4. 1 Evaluation de l'affinité par polarisation de fluorescence.....	68

A) Principe de la polarisation de fluorescence.....	68
B) Synthèse du conjugué adénine-fluorescéine	69
IV. Discussion	72
1. Sélection d'aptamères anti-adénine.....	73
2. Evaluation des versions raccourcies de l'aptamère anti-adénine.....	73
3. Perspectives	74
3. 1 Stratégies d'optimisation de l'aptamère raccourci A'12c	74
3. 2 Stratégie de développement de biocapteurs	74
3. 2. 1 Evaluation de la stabilité des complexes « kissing » en présence de méthanol	75
3. 2. 2 Méthode d'évaluation des complexes« kissing » en présence de méthanol	75
3. 2. 3 Résultats préliminaires	76
3. 2. 4 Analyse des résultats préliminaires	77
V. Conclusion.....	78
VI. Références bibliographiques.....	81

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
XNA : xeno nucleic acid
ARN: acide ribonucléique
LNA: Locked Nucleic Acid
NAD: nicotinamide adénine dinucléotide
ATP: adénosine triphosphate
ADP: adénosine diphosphate
GTP: guanosine triphosphate
GDP: guanosine diphosphate
GMP: guanosine monophosphate
CTP: cytidine triphosphate
UTP: uridine triphosphate
sRNA: small RNA
5-IU: 5-iodouracile
dDOTP: 5 -(octa1,7-diynyl)-2'-deoxyuridine
ARNr : ARN ribosomal
UV : ultraviolet
N : cytosine, thymine (ou uracile), guanine ou adénine
Y : cytosine ou thymine
S : cytosine ou guanine
B : cytosine, guanine ou thymine
V : cytosine, guanine ou adénine
5'-UTR: UnTranslated Region
siARN: petit ARN interférents
ARNt: ARN de transfert
ARNr: ARN ribosomal
IVS: interveninng sequence
RNAse P: ribonucléase
B.subtilis : Bacillus subtilis
E. coli: Escherichia coli
SPR : résonance plasmonique de surface
CE : électrophorèse capillaire
Mg : magnésium

mM : millimolaire
nM : nanomolaire
nm : nanomètre
pM : picomolaire
HIV : virus d'immunodéficience humaine
HIV1-RT : transcriptase inverse du virus d'immunodéficience humaine
FGFb: basic fibroblast growth factor
K_D: constante de dissociation
EC₅₀: concentration efficace médiane
IC₅₀: concentration inhibitrice médiane
HNE : neutrophile élastase
VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
SOMAmer: Slow Off-rate Modified Aptamer
TTA1 : aptamère dirigé contre la tenascine-C
SAM : S-adenosyl méthionine
DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge
PCR : réaction en chaîne de polymérisation
SELEX : évolution systématique des ligands par enrichissement exponentiel
HCN : hydrogène cyanide
μM : micromolaire
ValP : valyl phosphonate
ARDS : syndrome de détresse respiratoire aiguë
CZE : électrophorèse capillaire de zone
DMSO : diméthylsulfoxyde
EDC : 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
MES : 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
HPLC: High-performance liquid chromatography
B-AZ: billes azido
SPR : résonance plasmonique de surface
TBTA : tris (benzyltriazolylméthyl) amine
PEG : polyéthylène glycol
RMN : résonance magnétique nucléaire
TBA : aptamère anti-trombine
Q : quencher
F : fluorophore
mp : millipolarisation
BM : balise moléculaire

Apta-B M : aptamère balise moléculaire

Module-S : module de signalisation

Module-T : module de transduction

Module-R : module de reconnaissance

Module-TSP : module de transduction spécifique

DFHBI : 3,5-difluoro-4-hydroxybenzylidene imidazolinone

I. Introduction générale

1. Préambule

A la fin des années 1960, l'hypothèse d'un système métabolique autonome, composé exclusivement d'ARN, a émergé¹. Celle-ci est plausible si les molécules d'ARN sont capables d'assurer des fonctions effectuées par les protéines dans le métabolisme contemporain. Il a été suggéré que les coenzymes comme le NADH qui incorporaient des nucléosides, ils seraient des fossiles d'une période où l'ARN fonctionnait sans l'assistance des protéines, et que le ribosome primitif aurait été composé exclusivement d'ARN^{4,2,3}.

En 1981, Cech et coll.⁴ ont mis en évidence l'existence d'une activité catalytique au niveau de l'ARN ribosomal (ARNr) isolé à partir du noyau du protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila*. La catalyse requiert la présence d'un co-facteur, la guanosine, ou de l'un de ces dérivés (GTP, GDP et GMP)⁵.

La fonction catalytique caractérisée est représentée par le clivage du précurseur de l'ARN ribosomal (pre-ARNr) au niveau de la séquence IVS (intervening sequence). Cette dernière est excisée sous forme d'une molécule unique qui sera par la suite cyclisée. Ce processus est suivi par une activité de ligation au niveau de l'ARNr. Le remplacement de la guanosine par l'ATP, l'UTP, le CTP inhibe l'activité catalytique ; les 3 réactions excision, ligation et cyclisation se produisent dans les mêmes conditions (concentration de cations et de guanosine), suggérant qu'une fonction moléculaire unique serait responsable à la fois des 3 réactions. Selon le modèle proposé, la guanosine représente un co-facteur qui fournit le groupement libre 3' hydroxyle nécessaire pour initier la série des 3 transferts de l'épissage du pre-ARNr, la figure ci-dessous montre le modèle proposé comme mécanisme d'action.

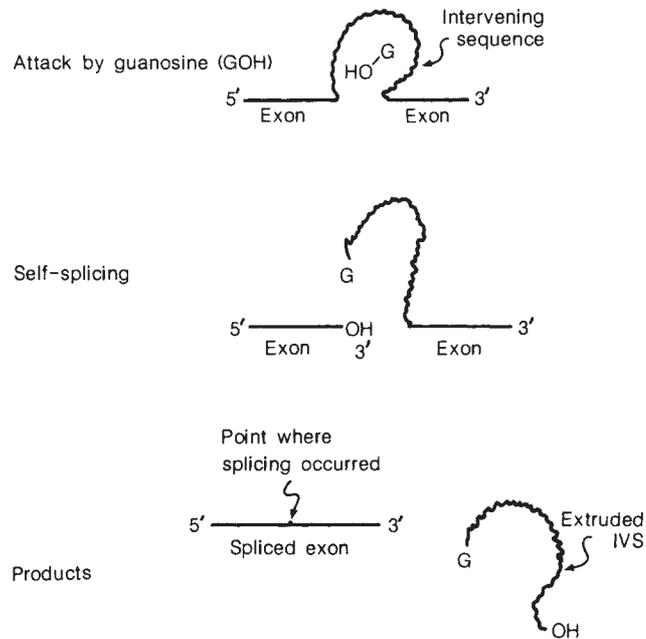


Figure 1 : Schéma représentant le mécanisme d'auto-épissage de l'ARN de *Tetrahymena thermophila*⁶

Par définition, un catalyseur accélère une réaction sans qu'il subisse de changements, il est régénéré à la fin de la réaction. L'épissage du pre-ARNr ne s'accorde pas parfaitement avec la définition précédente, la réaction est intrinsèque et le pre-ARNr n'est pas régénéré à la fin de la réaction.

Un an plus tard, Altman et coll.⁷ ont mis en évidence une activité catalytique assurée par un ARN associé à des protéines, l'ensemble formant une enzyme connue sous le nom de ribonucléase P (RNaseP). Cette dernière est formée de sous-unités protéiques et d'ARN : M1 ARN/C5 protéine purifiée à partir de *E. coli* et P-ARN/protéine-P est purifiée à partir de *B. subtilis*.

Les auteurs⁷ ont montré qu'en présence de 10-60 mM de magnésium les sous-unités ARN des deux bactéries sont capables de cliver les précurseurs de l'ARN de transfert (pre-ARNt) ; les sous-unités protéiques ne sont pas essentielles : seules, elles sont dépourvues d'activité catalytique. A des concentrations inférieures en magnésium 5-10 mM, les deux sous-unités protéiques et ARN sont requises pour l'activité. Des expériences de reconstitutions *in vitro*, effectuées en présence de faibles concentrations de Mg^{2+} , ont montré que les sous-unités protéiques et ARN de la même espèce bactérienne peuvent former des complexes avec celles d'une autre espèce. Cependant, lorsque l'ARN 4.5S de *E. coli* est utilisé comme substrat, seul le M1ARN de *E. coli* est actif et cela quelle que soit l'origine des sous-unités protéiques. Cette étude montre que

l'action catalytique est spécifique à l'ARN de la même espèce et donc probablement que celui-ci serait doté d'éléments qui seraient reconnus spécifiquement par l'ARN catalytique de la même espèce⁷. La découverte d'Altman a permis de consolider le rôle catalytique des ARN, car, dans ce cas, il ne s'agit pas de réaction intrinsèque qui pourrait être assimilée à une simple réaction d'autocatalyse.

Ultérieurement, Westheimer⁶ a mis en avant le caractère enzymatique du mécanisme d'auto-épissage décrit par Cech⁵, en s'appuyant sur la spécificité de la réaction de catalyse, la rapidité de la réaction (par rapport à une réaction d'hydrolyse spontanée d'ARN), l'implication de la structure tridimensionnelle de l'ARN et le site spécifique de reconnaissance ainsi que la distance entre les groupements en réaction.⁶

En se basant sur l'ensemble de ces résultats, Walter Gilbert⁸ a introduit la théorie du monde ARN qui aurait précédé le système métabolique contemporain. La première étape du processus d'évolution serait caractérisée par la présence d'une molécule d'ARN ayant une activité catalytique nécessaire pour son auto-assemblage. De ce fait, la reconnaissance spécifique des unités de base, comme les nucléotides et leurs dérivés, constituerait une étape cruciale de la catalyse. De même, des ARN capables d'interagir spécifiquement avec les acides aminés constitueraient des adaptateurs capables de lier les acides aminés actifs et de les arranger selon une matrice ARN. Cela serait probablement possible en présence d'autres ARN, comme l'ARN ribosomal. Ce processus pourrait conduire à la synthèse des premières protéines. Il a été suggéré⁸ que les protéines ne catalysaient pas plus de réactions de différentes natures que les ARN, néanmoins, les catalyseurs protéiques vont dominer, car capables de catalyser les mêmes réactions avec de meilleures efficacité et rapidité.

A la fin, l'ADN apparaîtrait comme le porteur ultime de l'information ; celui-ci serait copié à partir des molécules d'ARN par transcription inverse. Les molécules d'ADN sont plus stables et permettent une activité de correction grâce à l'organisation en double brin ; en parallèle, les polymères d'ADN seraient capables d'introduire des mutations, ou seraient sujets à des recombinaisons.⁸

2. L'émergence de l'idée d'évolution à l'échelle moléculaire

L'ensemble de ces travaux a contribué à l'établissement de modèles hypothétiques de l'émergence de la vie, mais aussi à consolider l'idée d'un système évolutif à l'échelle moléculaire⁹. L'application d'une pression de sélection sur des molécules requiert la présence de variants (moléculaires) qui comportent une information, « le génotype ». Cette dernière serait transmise à des polymères naissants et s'exprimerait sous forme de

conformation fonctionnelle, « le phénotype ».

Dans le cas des acides nucléiques comme l'ARN, le génotype et le phénotype sont localisés sur la même molécule, ils sont présentés respectivement par : la séquence qui peut être copiée par les polymérases, et les propriétés fonctionnelles qui varient selon l'organisation structurale de ces polymères. Si l'évolution et/ou la sélection *in vitro* permettent la sélection de biomolécules fonctionnelles, mimer ce mécanisme représente un intérêt, pour identifier des acides nucléiques ayant de nouvelles propriétés catalytiques ou des propriétés de reconnaissance moléculaire. La figure 2 représente le schéma du modèle d'évolution *in vitro* basé sur l'ARN proposé par Joyce en 1989⁹.

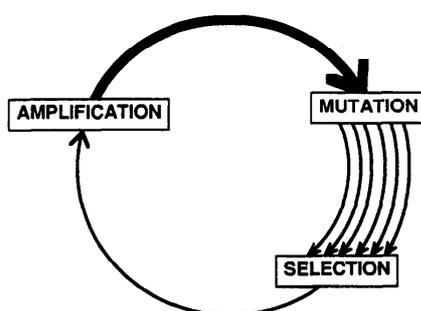


Figure 2 : Schéma du processus d'évolution *in vitro*⁹.

Les variants ARN sont générés par l'introduction de mutations, les ARN ayant la fonction recherchée sont sélectionnés et amplifiés par les polymérases (transcriptase inverse, ADN polymérase et ARN polymérase) et soumis à un nouveau cycle d'évolution *in vitro*.

Le processus de sélection *in vitro* est initialement appliqué sur des populations ARN générées à partir de variants sauvages dont les fonctions sont identifiées^{10, 11}. Ultérieurement, des populations ARN complètement aléatoires sont soumises à une pression de sélection¹² dans le but de sélectionner des candidats dotés de nouvelles propriétés fonctionnelles.

2. 1 Sélection basée sur des matrices ARN naturels

a) La catalyse

L'ARN catalytique (ribozyme) identifié au niveau du rARN de *Tetrahymena Thermophila*⁵ est initialement utilisé comme matrice. La fonction principale de ce dernier est la catalyse du clivage et la ligation spécifiques sur des substrats ARN (voir la figure 1).

Robertson et coll.¹⁰ ont exploité la possibilité de sélectionner un ARN capable de

catalyser la même réaction que le variant sauvage, mais sur des substrats ADN. A cet effet, des variants structuraux sont générés, ils constituent la population de départ. Chaque variant ARN comporte sur l'extrémité 3' une guanosine, dont le groupement hydroxyle attaque la liaison phosphodiester au niveau de l'extrémité 3' d'une séquence spécifique et le premier nucléotide du substrat. Le produit de la catalyse obtenu est formé du ribozyme et du substrat lié en amont. Le processus de sélection est basé sur l'amplification sélective : une amorce complémentaire à la jonction entre le ribozyme et le substrat est utilisée pour initier la transcription inverse et l'amplification des candidats fonctionnels. L'ADNc produit subit un processus de mutagenèse¹³, permettant la production de nouveaux mutants ARN. Ces derniers sont utilisés pour un nouveau tour de sélection, amplification et mutation. La figure 3 représente le schéma de la stratégie de sélection adoptée.

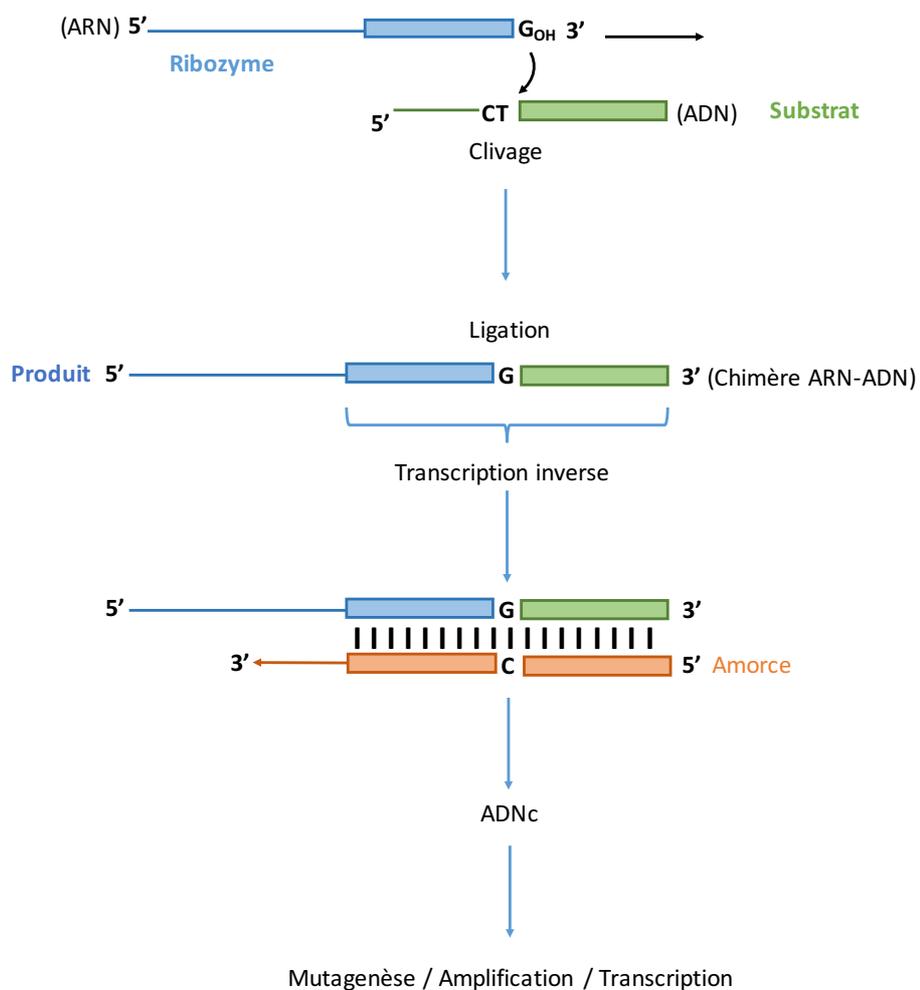


Figure 3: Stratégie d'évolution *in vitro* du ribozyme catalysant la réaction de transestérification sur des substrats ADN.

La stratégie présentée ci-dessous a permis la sélection du premier ARN catalysant le clivage et la ligation d'ADN, les auteurs de cette étude ont suggéré que les polymères d'ARN auraient eu un rôle dans l'insertion d'éléments de séquence au niveau de l'ADN génomique à un stade primitif de la vie.

Cette étude a mis en évidence le potentiel de la stratégie d'évolution *in vitro* dans la génération de nouveaux variants moléculaires, dotés de nouvelles propriétés. Cette méthode pourrait être étendue à la sélection pour des propriétés de reconnaissance moléculaire.

b) La reconnaissance moléculaire

En 1990, Gold et Tuerk¹¹ étudièrent l'interaction entre l'ADN polymérase gp43 du bactériophage T4, et l'ARNm de la même enzyme. La séquence minimale reconnue par l'enzyme est constituée de 36 nucléotides, elle est structurée en une tige formée de 5 paires de bases et une boucle apicale formée de 8 nucléotides. La formation du complexe gp43/ARN constitue un mécanisme d'auto-régulation : il interfère avec la séquence de Shine et Delgarno, et provoque un blocage de l'initiation de la traduction. La même structure ARN a été identifiée au niveau de l'ARNm de l'ADN polymérase du bactériophage Rb69, ce dernier est considéré comme éloigné du bactériophage T4 du point de vue évolutif.

Pour comprendre le facteur responsable de la dominance de la séquence ARN, la séquence qui correspond à la boucle est remplacée par une séquence aléatoire composée de 8 nucléotides, chaque position de cette dernière correspond à l'un des 4 nucléotides (A, C, G ou U), le nombre de combinaisons possibles est de $4^8 \approx 10^5$, correspondant à la diversité de la population d'ARN générée.

Cette population est soumise au processus d'évolution *in vitro*, le critère de sélection est la reconnaissance de l'enzyme gp43. Les candidats ARN formant des complexes avec cette dernière sont sélectionnés par filtration, amplifiés et soumis à de nouveaux cycles de sélection/amplification. Après plusieurs tours, la population ARN est enrichie par des candidats ARN liant l'enzyme gp43, ces derniers sont clonés et séquencés. L'analyse des candidats ARN sélectionnés a montré que la séquence précédemment identifiée au niveau des deux bactériophages T4 et Rb69 est également sélectionnée. Une autre séquence est également sélectionnée, elle diffère sur 4 positions de l'ARN sauvage, les constantes de dissociation des deux ARN sélectionnés sont similaires ($\approx 4, 8$ nM).

Cette étude a montré que le processus d'évolution *in vitro* peut être appliqué pour la sélection sur critère de reconnaissance moléculaire, le processus expérimental utilisé est nommé par les auteurs de ce travail « Evolution systématique des ligands par enrichissement exponentiel (SELEX) », cette appellation sera ultérieurement généralisée sur tous les processus de sélection ou d'évolution *in vitro* basés sur les acides nucléiques et effectués principalement sur critère de reconnaissance moléculaire.

2. 2 Sélection basée sur des matrices ARN complètement aléatoires

Si on considère que les premiers catalyseurs ont émergé à partir de polymères composés de séquences aléatoires, on peut se demander quelle serait la probabilité qu'une séquence aléatoire de polynucléotides se structure pour former une conformation tridimensionnelle stable, comportant une fonction spécifique, et quel serait le nombre de classes de structures fondamentalement différentes capables d'effectuer une fonction de reconnaissance spécifique catalytique ou une activité de liaison.

Pour tenter de répondre à cette question, Szostak et Ellington¹² ont utilisé une population ARN composée de séquences complètement aléatoires (N =100 nt), qu'ils ont soumise à un processus d'évolution *in vitro* pour sélectionner des acides nucléiques ayant une fonction de reconnaissance spécifique.

Les petites molécules (colorants) utilisées comme cibles de la sélection sont : le Cibacron blue 3GA, le Reactive Red 120, le Reactive Green 19 et le Reactive Blue 4. Les molécules cibles sont immobilisées sur des colonnes d'affinité, elles permettront de séparer les variants ARN liés à la cible. Ces derniers sont élués et soumis à une transcription inverse. Les copies produites sont à nouveau transcrites en ARN et les nouveaux transcrits sont soumis à un autre cycle de sélection/amplification ; la figure 4 représente un schéma du processus de sélection utilisé.

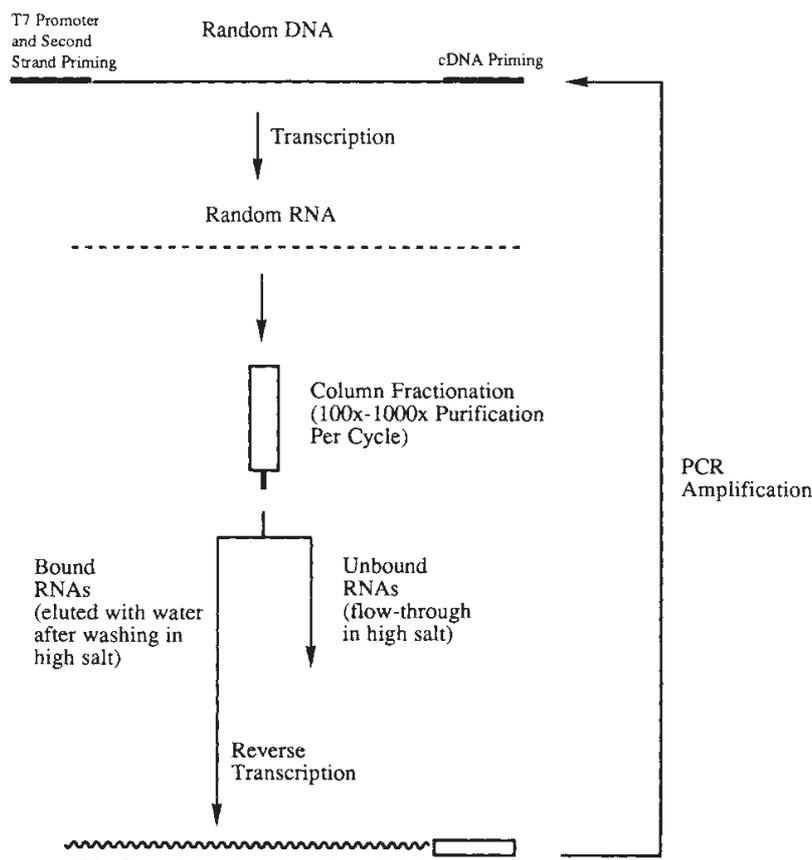


Figure 4 : Processus de sélection *in vitro* utilisé

A l'issue du processus de sélection, les séquences obtenues sont analysées, les résultats obtenus ont montré que ces séquences sont capables de lier spécifiquement les colorants organiques. L'analyse des sous-populations sélectionnées a permis aux auteurs de suggérer qu'approximativement une séquence sur 10^{10} serait capable de se structurer pour former un site de fixation pour une petite molécule. Les ligands ARN développés sont nommés, par les auteurs de ce travail, « aptamères ».

Les auteurs ont aussi soutenu la possibilité de sélectionner des polymères d'ARN catalytiques (ribozymes) à partir d'une population ARN aléatoire, si cette dernière est soumise à une sélection contre des analogues d'un état de transition³.

Ultérieurement, plusieurs études utilisant la méthode SELEX sont apparues dans les deux années qui ont suivi les trois précédemment décrites^{11,12}, celles-ci ont eu un impact sur l'orientation et les perspectives d'application de la méthode SELEX.

3. L'application de la sélection *in vitro* en biotechnologie

Dans un premier temps, cette méthode a été utilisée pour la sélection de séquences ARN capables de reconnaître spécifiquement des protéines qui interagissent naturellement avec les ARN. L'objectif était d'orienter la sélection vers l'identification de séquences consensus au niveau des ARN naturels. Le SELEX dirigé contre la protéine gp43¹¹, constitue une preuve de ce concept ; une autre sélection dirigée contre une protéine de l'enveloppe virale du bactériophage R17¹⁴ a permis l'identification d'aptamères capables de reconnaître spécifiquement cette protéine et ils comportent un motif retrouvé dans la séquence virale naturelle.

Le SELEX a été aussi utilisé pour l'identification de motifs structuraux, l'un des exemples étudiés est celui de l'élément d'ARN viral liant la protéine virale Rev du virus HIV de type 1 (HIV-1)¹⁵. La population ARN initiale est composée de variants dont 65 % des positions (66 au total) correspondent à la séquence sauvage, 30 % des positions sont aléatoires et 5 % ont été supprimées. La stratégie adoptée, permet aux résidus qui interagissent entre eux d'être sélectionnés de façon concertée. Elle assure aussi la conservation de la majorité des interactions présentes dans la séquence sauvage. L'analyse des séquences sélectionnées et des covariations a permis l'identification d'un motif d'intérêt, un mésappariement G : G tige¹⁵.

Toujours dans le volet d'exploration des interactions protéine/acides nucléiques, des aptamères ont été sélectionnés pour la reconnaissance de la transcriptase inverse du HIV-1 à partir d'une banque aléatoire (N=32)¹⁶. La particularité de ces aptamères est la présence d'au moins un candidat, capable d'inhiber l'activité de la transcriptase inverse une fois lié à l'enzyme, ayant comme conséquence l'inhibition de la synthèse de l'ADN codant (ADNc) du virus. Cette étude a révélé le potentiel des aptamères à inhiber l'activité d'une cible protéique, permettant ainsi de suggérer l'utilisation des aptamères comme des agents thérapeutiques contre les pathologies virales.

L'inhibition enzymatique ne constitue pas l'unique fonction des aptamères exploitable en thérapie. En effet, l'identification d'un aptamère ARN capable de désactiver une voie de signalisation cellulaire est venue renforcer et étendre cette application. Ce dernier a été sélectionné contre le facteur de croissance fibroblastique basique FGFb¹⁷. L'aptamère est un compétiteur de l'héparine qui se lie naturellement au facteur de croissance, il est très spécifique avec une haute affinité, la constante de dissociation la plus faible calculée pour l'un des variants est de $0,13 \pm 0,03$ nM. Cet aptamère empêche la liaison du facteur de croissance à son récepteur membranaire, provoquant ainsi la désactivation de la voie de signalisation cellulaire du FGFb.¹⁷

En plus des protéines, les aptamères sont capables de reconnaître des petits ligands.

Dans la continuité des travaux précédents sur la biochimie primitive, plusieurs sélections ont été effectuées pour l'identification de ligands ARN capables de reconnaître des petites molécules comme les acides aminés¹⁸ ou des nucléotides¹⁹. Le but est, d'une part, d'identifier des motifs ARN qui auraient joué un rôle d'adaptateur dans le métabolisme primitif et, d'autre part, d'analyser la nature des interactions engagées par les ligands ARN et de comparer leurs propriétés avec celles des protéines. Dans ce cadre, une sélection a été effectuée pour mettre l'accent sur la stéréospécificité des acides nucléiques en interaction avec leurs substrats. La sélection a été dirigée contre le D-tryptophane à partir d'une banque aléatoire. Les séquences sélectionnées ont la capacité de discriminer entre les deux énantiomères, la constante de dissociation étant de 18 μM pour le D-tryptophane et de 12 mM pour le L-tryptophane.²⁰

Ultérieurement, le potentiel de l'ADN pour la liaison spécifique de cibles moléculaires a été exploré²¹. Une sélection à partir d'une banque ADN a été effectuée, les cibles sont Cibacron Blue and Reactive Green 19. Les aptamères sélectionnés sont capables de lier leurs cibles avec une affinité comparable à celle des aptamères ARN qui lient les mêmes cibles¹².

4. Amélioration et adaptation de la sélection *in vitro*

L'ensemble des études décrites ci-dessus constitue une phase primitive du développement des aptamères par la technologie SELEX. Celle-ci va subir plusieurs changements qui vont permettre d'étendre son application pour le développement de nouveaux aptamères ou de l'exploiter comme approche analytique. Les auteurs ayant décrit le SELEX la première fois^{11,12} s'accordaient sur le fait que des changements ou des améliorations au niveau de cette méthode pourraient permettre de produire des aptamères avec une meilleure affinité et de nouvelles propriétés. L'optimisation de la méthode SELEX pourrait s'opérer sur les éléments principaux qui fondent cette méthode : la diversité, la sélection et l'amplification.

4.1 La diversité

La diversité est représentée par l'ensemble de séquences différentes qui composent la population initiale. De nouveaux variants pourraient ainsi être générés lors de l'amplification par incorporation de mutations. L'obtention d'un acide nucléique ayant une fonction désirée repose sur l'adaptabilité de la pression de sélection imposée à la nature de la population. La nature chimique de la population de départ et sa conception représentent les deux éléments primordiaux pour construire une stratégie de sélection, car ils seront les facteurs déterminants du résultat de la sélection.

4. 1. 1 Conception de la banque

La banque d'acides nucléiques est composée généralement de séquences aléatoires et des régions constantes indispensables pour la manipulation enzymatique. Ce modèle simple pourrait être modifié selon la longueur de la séquence aléatoire, le type de la répartition aléatoire ou l'insertion des séquences constantes. Au-delà de la manipulation enzymatique, les séquences constantes pourraient aussi être insérées pour l'obtention d'aptamères ayant des propriétés particulières, comme le dessin d'une structure tridimensionnelle imposée. La région aléatoire peut être insérée de trois manières différentes : complète, segmentaire ou partielle²².

A) Répartition aléatoire complète

La banque comporte dans ce cas des fenêtres complètement aléatoires (30 à 60 nucléotides) ; c'est la stratégie la plus fréquente. Souvent utilisée pour l'identification d'aptamères dirigés contre des cibles dont les interactions avec les acides nucléiques ne sont pas exploitées antérieurement, elle permet la sélection de nouveaux motifs.

B) Répartition aléatoire partielle

Il s'agit d'introduire des randomisations ponctuelles sur une séquence unique, préalablement identifiée, ayant une fonction bien définie. Cette stratégie est adoptée dans le but de déterminer et caractériser des résidus indispensables pour la reconnaissance et la formation d'une structure spécifique. L'un des exemples illustrant cette stratégie est celui du SELEX dirigé contre la protéine Rev¹⁵. Les variations introduites par cette stratégie sont semblables aux mutations retrouvées dans la nature, mais avec une plus grande fréquence.

C) Répartition aléatoire segmentaire

La stratégie segmentaire est un compromis entre la randomisation partielle et la randomisation complète. Il s'agit d'introduire des séquences aléatoires courtes au niveau d'un acide nucléique ayant des propriétés spécifiques connues (catalytique, reconnaissance ou autre).

La longueur des régions à randomiser dépend d'une part de la fonction recherchée et de son exploitation. Les séquences constantes sont dans ce cas aussi importantes que les régions aléatoires. L'un des exemples illustrant cette stratégie est la sélection d'aptamère qui lie la protéine gp43¹¹ ; en effet, la stratégie segmentaire est utilisée sur des séquences naturelles adoptant une structure donnée où une partie de celle-ci est randomisée. Cette stratégie est importante dans la mesure où elle permet d'orienter la sélection vers des structures bien définies. En effet, grâce à cette stratégie, des modèles structuraux particuliers pourraient être obtenus sur des banques (synthétiques) prédéveloppées

dans le but d'introduire un phénotype additionnel en plus de la reconnaissance moléculaire.²³

D) Limite de la répartition aléatoire

Indépendamment du fait que les séquences aléatoires utilisées soient plus au moins longues, la complexité de la banque est limitée par la synthèse chimique de l'ADN : le rendement typique d'une synthèse d'un oligonucléotide de 100 bases à une échelle de 1 μ mol est de 13,5 % soit 13,5 nanomoles $\approx 10^{16}$ molécules²⁴. Par conséquent, des banques aléatoires complètes contenant toutes les séquences possibles sont celles qui sont constituées de fenêtres aléatoires composées 27 résidus ($4^{27} \approx 10^{16}$). Une banque contenant une fenêtre aléatoire composée d'un nombre de résidus > 27 serait par conséquent incomplète. Elle ne serait cependant pas moins représentative de la population, car la population composée de 22 nucléotides serait incluse, et elle permettrait la formation de motifs plus longs.²²

4. 1. 2 Chimie de la banque

Bien que les polymères naturels ADN et ARN aient permis la sélection d'une séquence présentant une haute affinité et une haute spécificité, ils sont soumis à la dégradation, causée par l'hydrolyse, favorisée par la variation du pH et de la température dans le cas des ARN. Les nucléases présentes dans les fluides et les tissus biologiques^{25, 26} dégradent les deux polymères ADN et ARN, leurs demi-vies dans l'organisme allant de quelques minutes pour les ARN, à quelques minutes voire quelques heures pour l'ADN. Outre la stabilité des acides nucléiques naturels, leur diversité est limitée à quatre nucléotides : l'adénosine, la guanosine, la cytidine, l'uridine (ARN) et la thymidine (ADN), permettant un nombre d'interactions et de fonctions limité.

Pour améliorer les propriétés des acides nucléiques et élargir leurs fonctions, des modifications spécifiques sont introduites selon la propriété recherchée.

Les parties sucre et pont phosphodiester sont principalement ciblées. Les modifications sont introduites à des positions uniques (substitutions partielles) ; ou bien plusieurs parties du squelette sucre phosphates sont remplacées, générant de nouveaux polymères analogues aux ARN et ADN non naturels. Outre la stabilité des acides nucléiques, des modifications chimiques sont introduites pour intégrer de nouvelles propriétés et permettre de nouvelles interactions. Des groupements peuvent être introduit au niveau des bases azotées, principalement sur la position 5 des pyrimidines. L'ensemble des séquences modifiées est appelé XNA, pour « xeno nucleic acid », même si cette appellation est parfois réservée aux polymères ayant subi des substitutions totales au niveau du sucre.

La soumission d'une population de séquences XNA à une pression de sélection est possible, si les ADN et les ARN polymérases naturelles acceptent les analogues comme substrats afin d'assurer la réplication des candidats. Dans le cas contraire, des modifications post-SELEX peuvent être envisagées, même si l'affinité des aptamères pour leur cible peut en être altérée. Ci-dessous, une classification selon le type de modification utilisée pour le développement des aptamères.

4. 1. 2. 1 Modification au niveau du sucre

A) Substitution de la position 2'-OH du ribose

Les nucléotides substitués sur la position 2'OH sont introduits dans le but d'obtenir des aptamères stables dans les fluides biologiques et augmenter leur temps de demi-vie ($t_{1/2}$). L'ensemble de ces propriétés est indispensable pour le développement d'aptamères pour une application thérapeutique.

Cette stratégie a été adoptée la première fois²⁷ pour sélectionner un aptamère reconnaissant la neutrophile élastase (HNE). La banque d'oligonucléotides initiale a été produite à partir d'une banque ADN matrice en incorporant des nucléotides pyrimidines dont le OH sur la position 2' est substitué par un groupement amine (2'-NH₂-UTP et 2'-NH₂-CTP). La séquence modifiée sélectionnée pour la liaison à l'enzyme HNE a été testée pour sa stabilité dans les fluides biologiques (sérum et urine). Les résultats obtenus montrent une stabilité significative comparée aux oligonucléotides non modifiés avec une demi-vie supérieure : $20.2 \pm 0,3$ h dans le cas de l'aptamère modifié et moins de 4 minutes dans le cas de l'ARN non modifié.

Bien que ce dernier dispose d'une haute affinité (nanomolaire) et une stabilité adaptée pour une application *in vivo*, l'aptamère n'est pas capable d'inhiber l'activité enzymatique de la HNE ; les auteurs proposaient leur travail comme une nouvelle stratégie pour le développement de nouveaux aptamères à des fins thérapeutiques²⁷.

Les mêmes nucléotides modifiés ont été utilisés ultérieurement pour le développement d'autres aptamères, comme dans l'exemple de la sélection dirigée contre le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)²⁸. La surexpression de ce dernier est corrélée avec différentes formes de néovascularisation oculaire, qui contribuent à une perte de vision sévère, incluant la dégénérescence maculaire. Des séquences incorporant des nucléotides modifiés (2'-NH₂-UTP et 2'-NH₂-CTP) ont été sélectionnées ; elles présentent une affinité qui varie de 10^{-8} à 10^{-10} M ; certains nucléotides purines de cet aptamère ont été substituées par des nucléotides modifiés, dont le OH de la position 2' est substitué par un 2'-O-méthyle, et cela pour optimiser la résistance aux nucléases. Les positions choisies sont celles qui n'interfèrent pas avec la formation du complexe aptamère/cible.

Bien que cet aptamère présente une résistance aux nucléases, un autre facteur essentiel

pour une application *in vivo* a été introduit par Eaton et coll.²⁹, il s'agit de la stabilité thermique des aptamères. La flexibilité d'une conformation pourrait constituer un facteur majeur qui limiterait l'affinité et la spécificité des interactions. Les molécules qui peuvent facilement changer de conformation pourraient interagir avec des cibles variables ; cela se traduit par une faible spécificité et surtout par une diminution de l'affinité liée au coût énergétique du changement de conformation. Cependant, des aptamères qui adopteraient des structures rigides auraient tendance à lier moins de cibles et auraient une meilleure affinité.

Par conséquent, une nouvelle sélection pour le VEGF a été lancée en utilisant une banque avec des modifications 2'-fluoro pyrimidines³⁰. Les aptamères contenant des nucléotides 2'-NH₂-pyrimidines ont une stabilité de formation de duplexes (ARN /ARN, ADN/ADN ou ARN/ADN) moindre ³¹, les structures sélectionnées sont flexibles. Les nucléotides 2'-fluoro augmentent la stabilité thermique des structures en duplexes³², par conséquent, les conformations seraient plus rigides et elles disposeraient d'une meilleure affinité. Un SELEX a été réalisé à partir d'une banque incorporant des 2'-F-pyrimidines, les séquences sélectionnées ont été synthétisées en remplaçant certaines ou la totalité des positions 2' OH des nucléotides purines par 2'-O-méthyle (2'Ome), l'affinité des aptamères obtenus est de l'ordre du pM (49-130)³⁰. Parmi les séquences sélectionnées, l'une reconnaît avec une très grande affinité le VEGF₁₆₅ humain, elle a le potentiel d'inhiber la liaison du facteur de croissance VEGF₁₆₅ à son récepteur humain KDR et Flt-1, et est capable de réduire *in vivo* la perméabilité intradermique induite par le VEGF³⁰. Actuellement, cet aptamère est le premier et l'unique approuvé par la FDA (pegaptanib) ; il est commercialisé sous le nom du Macugen, indiqué pour le traitement de la forme néovasculaire de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).

B) Substitution totale du ribose par un autre analogue

Après le passage des ARN modifiés type 2'-NH₂-pyrimidine au 2'-F-pyrimidine, la recherche de structures stables du point de vue thermique et résistantes aux nucléases continue. Les LNA (Locked Nucleic Acid) sont des analogues d'oligonucléotides, dont le ribose est remplacé par un ribofuranose bicyclique formé par un pont méthylène entre le 2'-O et le Carbone en 4' (figure 5). Comme les ribonucléosides, les LNA adoptent une conformation de type C-3'endo, la formation des duplexes LNA : LNA sont décrits comme les plus stables du point de vue thermique.³³

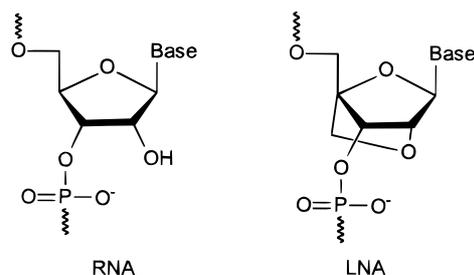


Figure 5 : Structure de nucléotides ARN et LNA

Ces modifications sont rapidement adoptées dans le but de générer des aptamères avec une stabilité de conformation optimisée.

L'une des études décrivant l'incorporation des LNA aux aptamères est représentée par des modifications post-SELEX de l'aptamère dirigé contre la tenascine-C : TTA³³. Le but était de développer un aptamère stable associé à des radioisotopes pour l'imagerie de tumeurs. La séquence de l'aptamère comporte des parties qui s'organisent en duplexes, des variants ont été générés en remplaçant les nucléotides naturels par des nucléotides LNA à des positions variables, de même pour les nucléotides purines, certaines d'entre elles comportent des modifications de type 2'Ome, les séquences ont été testées pour leurs stabilités thermiques et pour leurs affinités. Parmi les séquences choisies, l'affinité n'a pas été améliorée par rapport à l'aptamère non modifié ; par contre, une plus grande accumulation au niveau des tumeurs a été observée sur des modèles tumoraux de souris athymique « nude ». Les aptamères ayant subi des modifications post-SELEX avec des LNA présentent une meilleure résistance aux nucléases, mais pas une meilleure affinité ; dans certains cas, elle peut même être altérée en contraignant une flexibilité requise pour former des complexes aptamère/cible³⁴.

L'idéal est de réaliser une sélection en utilisant des banques incorporant les LNA, mais pour cela, il faut caractériser des polymérases qui soient capables d'incorporer ces nucléotides modifiés ou bien d'utiliser une méthode alternative qui permettrait l'évolution d'une population de XNA.

4. 1. 2. 2 Modification sur les ponts phosphodiesters

Les études décrites ont exploré la contribution de deux types de modifications : les phosphorothioates, principalement pour améliorer la résistance aux nucléases, et les boronophosphates, dans le cadre d'une thérapie expérimentale appelée thérapie de capture de neutron de bore.

Dans le cas des phosphorothioates, un oxygène liant est remplacé par un atome de soufre. Des banques comportant ce type de modification ont été utilisées la première fois pour sélectionner un aptamère reconnaissant le facteur de croissance bFGF, les nucléotides

modifiés étant incorporés par la T7 ARN polymérase³⁵. Le thioaptamère obtenu présente un K_D de $1,8 \pm 0,8$ nM, il est spécifique aux différents variants du bFGF³⁵. Un autre exemple intéressant de thioaptamère est la sélection d'un variant capable d'inhiber une enzyme du virus HIV-1, par la reconnaissance du domaine RNase H de la transcriptase inverse (HIV-1-RT). En inhibant l'activité de l'enzyme, il provoque une inhibition de la réplication virale et par conséquent une réduction de 50 % de la reproduction virale testée sur des inoculas.³⁶

La seconde substitution avec les atomes de bore est envisagée pour développer des aptamères capables d'adresser les atomes de bore à proximité de cellules tumorales. Lorsqu'ils sont bombardés par des neutrons, les atomes de bore émettent des particules α qui sont capables de détruire les cellules qui se trouvent à proximité. Par conséquent, le développement d'aptamères boronophosphate représente un intérêt pour un ciblage hautement spécifique des cellules tumorales. L'adaptabilité de ce type de modifications pour une utilisation dans le cadre d'un processus SELEX a été explorée en réalisant deux sélections ciblant l'ATP.

Une de ces sélections est réalisée en incorporant le bGTP³⁷ (guanosine 5'- α -P-borano triphosphates) et l'autre avec le bUTP (uridine 5'- α -P-borano triphosphate). Les deux populations sélectionnées comportent et tolèrent les nucléotides substitués; ces derniers sont mêmes essentiels pour certains variants d'acides nucléiques sélectionnés. Les variants incorporant le bUTP comportent un motif semblable à celui décrit dans le cas de l'aptamère ARN naturel reconnaissant l'ATP¹⁹. Cependant, dans le cas des variants bGTP, de nouveaux motifs ont été sélectionnés. Le changement de l'incorporation de bGTP dans les population bUTP et vice versa provoque une altération de l'affinité, suggérant une implication de ces substitutions dans la reconnaissance moléculaire³⁷.

4. 1. 2. 3 Substitution au niveau des bases azotées (pyrimidines)

Ce type de substitution est envisagé dans un premier temps pour intégrer certaines propriétés retrouvées dans les chaînes latérales des acides aminés incluant : le caractère cationique, anionique, l'hydrophobicité et la polarité.

Le but est d'élargir les réseaux d'interaction aptamère/protéine. Le premier exemple de nucléotides modifiés³⁸ au niveau des bases azotées est illustré par la deoxyuridine comportant un groupement hydrophobe 5-(1-pentynyl)-2'-deoxyuridine (5-pentynyl-dU). Ce dernier est incorporé dans une banque de sélection par amplification d'une banque ADN matrice avec la vent-ADN polymérase. La sélection est dirigée vers l'identification d'aptamères liant la thrombine, alors qu'un aptamère composé de nucléotides naturels avait déjà été sélectionné pour la même cible³⁹. L'aptamère modifié sélectionné dispose

d'une affinité comparable à celle de l'aptamère non modifié. Au niveau des variants naturels, une séquence consensus a été identifiée, celle-ci est absente dans l'aptamère comportant le 5-pentynyl-dU.

Une séquence consensus n'a pas été identifiée parmi les variants 5-pentynyl-dU ; par contre, un motif de structure secondaire est partagé. Les parties fixes (amorce) sont impliquées dans la conformation active et sont indispensables. L'aptamère conserve les mêmes propriétés fonctionnelles que l'aptamère naturel, incluant l'inhibition de l'activité enzymatique, cette dernière étant dépendante de la présence du 5-pentynyl-dU.

Une des études les plus récentes⁴⁰ montre le développement d'une nouvelle famille d'aptamères modifiés adaptés au développement de biopuces d'analyse de protéome à grande échelle. Celle-ci rapportera une signature protéique spécifique à une pathologie au niveau du plasma sanguin. Le développement de cet outil d'analyse requiert d'une part la sélection d'aptamères contre un grand nombre de protéines, et d'autre part, que ces derniers soient hautement spécifiques, car ils seront utilisés sur une matrice multiplexe.

La stratégie utilisée est basée sur deux axes : Le premier est d'enrichir la diversité chimique des banques ; pour cela, des nucléotides qui comportent des modifications mimant les chaînes latérales des acides aminés ont été utilisés (voir la figure 6).

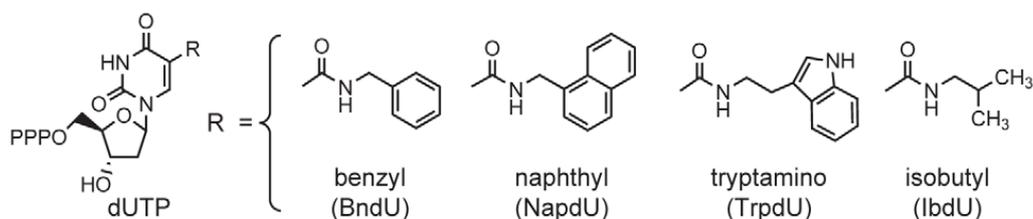


Figure 6 : Analogues de nucléotides triphosphates modifiés sur la position 5 (R) de l'uridine (dUTP) : 5-benzylaminocarbonyle-dU, (BndU), 5-naphthylmethylaminocarbonyle-dU (NapdU) : naphthylmethylaminocarbonyle-dU (NapdU); 5-tryptaminocarbonyle-dU (TrpdU) ; et 5-isobutylaminocarbonyl-dU (iBudU).⁴⁰

Le second est de sélectionner les aptamères ayant un temps de dissociation lent ($t_{1/2} \geq 30$ min) en présence d'un large excès de compétiteur polyanionique, permettant de dissocier les interactions non spécifiques. Les aptamères résultant de cette stratégie sont identifiés comme une nouvelle classe d'aptamères appelée SOMAmer pour « Slow Off-

rate Modified Aptamer »⁴⁰.

Dans un premier temps, la sélection à partir de banques modifiées a été testée sur des cibles protéiques qui n'ont pas permis préalablement le développement d'aptamères à partir de banques composées d'acides nucléiques naturels ADN et ARN. L'utilisation des banques modifiées a permis de sélectionner des aptamères pour ces cibles avec des K_D variant de 0.2 à 7 nM. Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus.

Target Protein	dT	benzyl-dU	isobutyl-dU	tryptamino-dU
4-1BB ^s	failed	6×10^{-9}	Failed	4×10^{-9}
B7 ^s	failed	1×10^{-8}	Failed	7×10^{-9}
B7-2 ^s	failed	Failed	Failed	6×10^{-9}
CTLA-4 ^s	failed	Failed	Failed	1×10^{-9}
sE-Selectin ^s	failed	Failed	Failed	2×10^{-9}
Fractalkine/ CXC3L-1	failed	Failed	Failed	5×10^{-11}
GA733-1 protein ^s	9×10^{-9}	3×10^{-9}	5×10^{-9}	5×10^{-10}
gp130, soluble ^s	failed	6×10^{-9}	2×10^{-8}	1×10^{-9}
HMG-1	failed	Failed	2×10^{-8}	5×10^{-9}
IR	failed	2×10^{-9}	1×10^{-8}	2×10^{-10}
Osteoprotegrin ^s	failed	5×10^{-9}	9×10^{-9}	2×10^{-10}
PAI-1	failed	4×10^{-10}	9×10^{-10}	2×10^{-10}
P-Cadherin ^s	failed	4×10^{-9}	5×10^{-9}	3×10^{-9}
sLeptin R ^s	failed	2×10^{-9}	Failed	5×10^{-10}

Tableau 1 : Résultats du SELEX en présence des nucléotides modifiés, comparés au SELEX ADN non modifié⁴¹

La stratégie utilisée avait permis d'identifier plus de 1000 aptamères modifiés reconnaissant des cibles protéiques humaines différentes. L'efficacité des SOMAmers a été testée pour définir une signature protéomique au niveau du plasma sanguin de patients atteints d'une pathologie rénale chronique CKD, pour « chronic kidney disease ». L'identification précoce de cette maladie permettrait de réduire les symptômes de la maladie. 813 SOMAmers différents ont été utilisés, les mesures sont faites simultanément et en solution. Les aptamères sont marqués avec la biotine et un groupement photoclivable, ils sont incubés avec les protéines du plasma, puis capturés sur des billes streptavidines, celles-ci sont lavées pour éliminer les protéines non liées. Les protéines liées à la surface des billes et formant des complexes avec les aptamères sont marquées à la biotine. Les complexes sont libérés suite à une irradiation aux UV et dilués en présence d'un large excès de compétiteur anionique (le dextran sulfate).

Les complexes sont à nouveau capturés via les protéines marquées à la biotine. Un second lavage intensif est appliqué pour éliminer les SOMAmers non liés. Les

SOMAmers qui demeurent liés sont élués à un pH dénaturant et hybridés sur des séquences spécifiques complémentaires présentes sur une biopuce ADN classique. L'utilisation des aptamères modifiés a permis d'identifier 60 protéines qui varient significativement entre le stade précoce de la maladie et le stade tardif, ces dernières constitueront des biomarqueurs importants dans le diagnostic de la maladie. D'autres protéines qui marquent un aspect spécifique de la maladie sont identifiées dans le plasma de patients ayant la CDK avec un risque cardiovasculaire. La sélection des SOMAmers a permis d'étendre l'application des aptamères à la protéomique, et aussi de mettre l'accent sur l'importance de l'introduction de nucléotides modifiés pour améliorer les propriétés de reconnaissance des aptamères.

Les modifications des aptamères ne sont pas uniquement limitées au ciblage des protéines. Ainsi, un aptamère liant la thalidomide a été sélectionné à partir d'une banque modifiée⁴² ; celle-ci comporte une deoxyuridine ayant une fonction cationique liée par un linker méthylène de nature hydrophobe sur la position C5. Le nucléotide modifié est incorporé dans le but d'améliorer la stabilité en présence de nucléase et d'augmenter l'affinité de liaison au thalidomide. L'aptamère sélectionné est énantiosélectif, il lie le (R)-thalidomide avec une K_D de 1 μ M, sans présenter d'affinité significative pour son énantiomère. Lorsque le nucléotide modifié est remplacé par le dTTP naturel, l'aptamère est incapable de reconnaître les deux énantiomères (S et R).

4. 1. 2. 4 Autres approches SELEX basées sur des modifications de la banque

A) Photo-SELEX

C'est une approche qui permet de sélectionner des aptamères capables de lier spécifiquement des protéines, mais aussi de former des complexes stables via des interactions covalentes. Cette stratégie est basée sur l'incorporation des analogues de l'uracile, le 5-iodouracile (5-IU) ou le 5-bromouracile dans la banque de départ. Ces derniers sont réactifs sous irradiation UV monochromatique et forment des crosslink régiospécifiques entre les acides nucléiques substitués et la protéine cible.⁴³

Cette stratégie a été utilisée pour identifier des aptamères capables de se lier de façon covalente à la protéine Rev du virus HIV-1.

La banque ARN utilisée est substituée avec le 5-IU, et irradiée sous UV en présence de la protéine Rev. Les ARN liés à la protéine Rev sont séparés du reste de la population, amplifiés et utilisés pour un nouveau tour de sélection/amplification. Les tours de SELEX photo cross-link sont alternés avec des tours de sélection sur critère d'affinité. Cette stratégie a permis la sélection d'aptamères ayant une grande affinité pour la protéine Rev et de s'y lier de façon covalente.⁴⁴

B) Blended-SELEX

Il s'agit de fusionner une molécule chimique (non-acide nucléique) à une banque aléatoire d'acides nucléiques, dans le but de l'enrichir et de sélectionner des séquences qui vont contribuer à l'amélioration de la fonction de l'aptamère. Cette approche est décrite pour la première fois dans le cadre d'un SELEX dirigé contre l'élastase neutrophile humaine (hNE)⁴⁵, cible thérapeutique potentielle pour le traitement du syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS). Le valyl phosphonate (ValP) est un inhibiteur de l'élastase ; il est couplé à l'extrémité 5' d'une courte séquence d'ADN capable de s'hybrider à l'extrémité 3' d'une population ARN comportant une fenêtre aléatoire N=40. La banque formée est soumise à des sélections itératives. Les complexes Valp-ADN-ARN-élastase sont récupérés, les séquences ARN sont recyclées et réutilisées pour de nouveaux cycles de sélection. Les séquences contribuant à la liaison du ValP au site actif de l'enzyme sont ainsi sélectionnées. Les complexes sélectionnés augmentent le taux d'inactivation d'un facteur 15 comparé ValP seul, alors que les réactions croisées avec les autres serines protéases sont aussi réduites d'un facteur supérieur à 100.

De faibles doses du ValP-ARN sont suffisantes pour prévenir les dommages rénaux causés par les neutrophiles, les tests ont été effectués sur des modèles murins ayant l'ARDS. Le ValP-ADN-ARN n'affecte pas la viabilité des neutrophiles. L'inhibiteur de l'élastase généré par le blended-SELEX est beaucoup plus efficace et spécifique que le ValP. Cette approche est très efficace et pourrait être appliquée dans plusieurs domaines, elle permet d'élargir et renforcer les fonctions et les interactions moléculaires.

C) La technologie Spiegelmer

C'est une approche SELEX basée sur le principe de la chiralité ; elle permet de générer des aptamères de type L-ARN ou L-ADN qui représentent les énantiomères non naturels des acides nucléiques. Ils sont appelés « spiegelmer » parce qu'ils représentent l'image miroir des aptamères présentant la configuration naturelle du ribose (série D de Fischer). Les spiegelmer n'étant pas reconnus par les nucléases, ils peuvent trouver des applications *in vivo*, étant potentiellement plus stables et moins immunogènes que les (D)-aptamères.

Le développement des Spiegelmer est basé dans un premier temps sur une sélection *in vitro* à partir d'une banque initiale composée de D-ARN ou D-ADN (énantiomères naturels), contre l'énantiomère de la cible. Les séquences sélectionnées sont alors synthétisées en série L, capables de reconnaître ainsi la cible, et non pas son énantiomère. Cette stratégie est décrite pour la première fois par Klussmann et

collaborateurs.⁴⁶ Les auteurs sont parvenus à sélectionner un L-ARN de 58 nucléotides capable de reconnaître la D-adénosine, avec une constante de dissociation de 1,7 μ M similaire à celle du complexe D-ARN /L-adénosine. L'affinité du spiegelmer pour la D-adénosine est supérieure d'un facteur 9000 à celle pour la L-adénosine et inversement pour le complexe D-ARN /L-adénosine. Contrairement à l'aptamère D-ARN, le L-ARN est stable dans le sérum humain. Ultérieurement, le grand potentiel de la stratégie spiegelmer a été exploité pour le développement d'aptamères thérapeutiques : le emapticap pegol (NOX-E36 ; anti-CCL2), l'olaptased pegol (NOX-A12 ; anti-CXCL12) et le lexaptepid pegol (NOX-H94; anti-hepcidin) ⁴⁷. Ces composés sont en cours d'essais cliniques (phase II), après avoir démontré un bon profil de sécurité sur des volontaires en bonne santé. L'aptamère anti-CCL2 (emapticap pegol) est particulièrement efficace sur des patients atteints de diabète et les deux autres spiegelmer sont aussi prometteurs.

4. 2 La sélection

La sélection sur critère de reconnaissance moléculaire est principalement basée sur la séparation des oligonucléotides liés à la cible. La nature chimique et les tailles variables des cibles rendent difficiles la définition de règles communes et la façon dont il faut réaliser la sélection. Toutes les méthodes permettant la séparation de complexes moléculaires présentent un intérêt pour l'optimisation et l'adaptation de la stratégie SELEX aux différentes cibles incluant les ions, des métabolites, des protéines, voire des virus ou des cellules. Des méthodes de sélection classiques incluent l'utilisation des filtres pour séparer les complexes⁴⁸, la dialyse⁴⁹, les gels retards⁵⁰ et la capture avec des billes magnétiques.

De nouvelles technologies ont été associées au SELEX dans le but d'améliorer la résolution des sélections et réduire le temps et les efforts de réalisation, parmi celles-ci l'électrophorèse capillaire.

Outre les méthodes de sélection, l'établissement d'une stratégie de sélection est crucial pour sélectionner des ligands ayant une affinité et une spécificité pour la cible d'intérêt. L'introduction de conditions stringentes au cours de la sélection permet d'améliorer la résolution de la séparation, et de favoriser la sélection de candidats plus spécifiques.

Les premiers tours de sélection auraient besoin de conditions de sélection moins stringentes et de longues périodes d'incubation pour maximiser le rendement du peu de séquences fonctionnelles existantes dans la population initiale. La stringence pourrait être augmentée dans les derniers tours quand les séquences fonctionnelles commencent à prédominer. Plusieurs paramètres pourraient être optimisés au cours de la sélection, notamment le mécanisme de partition entre séquences liées à la cible et non liées et l'élimination des séquences non spécifiques ; les conditions de tampon devraient être

adaptées à la conformation active de la cible, des acides nucléiques et à son application. Depuis la première description de la stratégie SELEX^{11,12} plusieurs modifications du mécanisme de sélection ont eu lieu, certaines parmi les plus significatives étant décrites dans le paragraphe suivant.

4. 2. 1 Modifications basées sur la stratégie expérimentale adoptée

A) La sélection négative (Negative-SELEX)

L'utilisation d'un support pour immobiliser la cible est assez fréquente ; mais les candidats oligonucléotidiques interagissent avec les cibles et inévitablement avec l'environnement, incluant le support. Une incubation préalable de la banque avec le support (en l'absence de la cible) est souvent effectuée afin d'éliminer les séquences adsorbées, permettant ainsi d'enrichir la population en séquences interagissant exclusivement avec la cible. La sélection négative est adoptée rapidement juste après la première description du processus SELEX²¹.

B) Le contre-SELEX

La contre sélection se distingue de la sélection négative par le fait que cette dernière est introduite pour exclure des séquences qui reconnaissent une molécule bien déterminée, généralement un analogue à la cible de départ. Cette stratégie est développée la première fois pour la sélection d'un aptamère reconnaissant la théophylline. Dans un premier temps, la sélection est réalisée dans des conditions classiques, où une banque ARN (10^{14} , $N=40$) est soumise à une sélection sur une colonne d'affinité sur laquelle la théophylline est immobilisée.

Les molécules d'ARN sont éluées par 0.1 M de théophylline puis amplifiées. 0.05 % des séquences sont éluées après le 1^{er} tour de sélection, après 8 tours 62 % des ARN sont élués. La contre-sélection est introduite au 5^e tour. Les ARN liés sont élués de la colonne avec 0.1 M de caféine, un composé différant de la théophylline par la présence d'un groupement méthyle sur l'azote 7, 99.7 % des ARN liés à la colonne sont élués par la caféine. Les 0.3 % restants sont élués par la théophylline et soumis après amplification à de nouveaux tours de contre-SELEX. Au bout de trois tours de contre-sélection, 80 % des molécules ARN restent liées sur la colonne. Après analyse et caractérisation, l'aptamère identifié est capable de lier la théophylline avec un K_D de 0.1 μ M. Cette affinité de liaison est supérieure d'un facteur 10 000 à l'affinité de l'aptamère pour la caféine.

4. 2. 2 Adaptation des technologies à la méthode SELEX

Exemple 1) : l'électrophorèse capillaire

Le facteur temps est l'un des inconvénients du SELEX, à cause de la répétition des tours. Certaines méthodes de biophysique sont développées pour le SELEX dans le but de contourner ces problèmes ; parmi celles-ci, l'électrophorèse, et plus précisément

l'électrophorèse capillaire (CE), utilisée habituellement pour la séparation des molécules selon leurs charges.

Dans le cas du CE-SELEX⁵¹, la banque est pré-incubée avec la cible ; le milieu est ensuite injecté dans le capillaire. Sous un haut voltage, les acides nucléiques qui lient la cible ne présentent pas une mobilité similaire à celle des non liés. Une collecte de fractions de complexes cible/acides nucléiques est par conséquent possible. Ces derniers sont amplifiés, purifiés et réutilisés pour un nouveau tour de sélection. Cette technique ne requiert pas l'utilisation de support de sélection, permettant ainsi de réduire la surface d'interactions non spécifiques, de réduire les manipulations et enfin le temps de sélection.

Une des études ayant démontré le potentiel de cette technologie comparait la sélection d'un aptamère ADN anti HIV-1-RT sélectionné avec le CE-SELEX et un aptamère ADN dirigé contre la même cible, précédemment sélectionné par un processus SELEX classique. L'aptamère sélectionné par CE-SELEX possède une K_D de 180 pM qui se rapproche du K_D (40 pM) de l'aptamère ARN anti-HIVRT, sachant que l'ARN est le substrat naturel de la HIVRT, contrairement à l'ADN.

L'utilisation du CE-SELEX avait permis de réduire le nombre de tours de 9 (SELEX classique) à 4 pour obtenir un aptamère ayant une meilleure constante d'affinité.

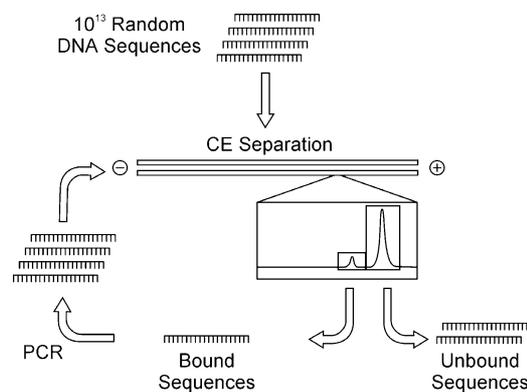


Figure 7 : Mécanisme de sélection par électrophorèse capillaire⁵¹

Exemple 2) : Le MonoLEX

C'est une stratégie permettant la sélection d'aptamères à partir d'un seul tour de sélection, d'où le nom MonoLEX⁵². La stratégie est basée sur l'association d'une étape unique de chromatographie suivie d'une segmentation physique fine de la résine. Après lavage intensif, les candidats immobilisés sur chaque segment sont amplifiés séparément par PCR quantitative en temps réel, permettant ainsi d'évaluer le taux

d'oligonucléotides fixés. Les produits PCR issus de chaque segment sont ensuite analysés et séquencés.

Cette approche a permis la sélection d'aptamères reconnaissant spécifiquement une particule d'orthopoxvirus (OPV). La sélection est effectuée en deux étapes : la première étant une sélection négative avec une chromatographie d'affinité effectuée sur le surnageant de culture cellulaire en l'absence du virus, et la seconde étape est une chromatographie réalisée sur des résines sur lesquelles les particules virales inactivées thermiquement sont immobilisées.

Les aptamères sélectionnés par l'approche MonoLEX sont validés par des études *in vitro* (SPR). Cependant, la cible moléculaire n'a pas été identifiée ; parmi les séquences sélectionnées, une est capable d'inhiber significativement la réplication *in vitro* de l'OPV avec un IC₅₀ de 0,59 µM. Cette méthode est suggérée comme une méthode rapide qui permettrait le développement d'un outil de détection ou thérapeutique contre un agent viral pathogène émergent non caractérisé.⁵²

5. La réplication (amplification)

Il s'agit du processus permettant de produire plusieurs copies à partir de séquences sélectionnées, la réalisation de plusieurs cycles de sélection et par conséquent l'enrichissement de la population.

Dans le cas des banques ADN, les séquences sont amplifiées avec des ADN polymérases et réutilisées pour le tour suivant. Dans le cas des banques composées d'ARN, les séquences sont rétro-transcrites par la transcriptase inverse en ADN ensuite amplifiées avec les ADN polymérases et transcrites en séquences ARN qui seront utilisées pour le tour suivant. Plusieurs paramètres doivent être pris en compte pour un enrichissement optimal avec les séquences d'intérêts. On peut citer : un design adapté des amorces, le choix d'une enzyme adaptée au type de modification chimique utilisée et à la fonction recherchée.

Il a été montré que le design des amorces pourrait contribuer à la prévention de la formation de séquences non spécifiques intermédiaires (avortons) et par conséquent optimiser l'enrichissement de la population⁵³.

Outre la technique utilisée, le choix de l'enzyme est primordial. Il est nécessaire de vérifier l'incorporation des nucléotides, particulièrement ceux comportant des modifications.

L'appartenance à une famille évolutive d'ADN polymérase est communément décrite comme étant un facteur prédictif de la capacité de ces dernières à incorporer correctement un nucléotide modifié. Des travaux antérieurs ont montré que les

enzymes appartenant à la famille B auraient tendance à mieux tolérer les modifications sur la position C5 des pyrimidines que les ADN polymérases appartenant à la famille A⁵⁴. Une sélection d'enzymes parmi celles qui sont commercialisées représente dans un premier temps un moyen pour générer et amplifier des banques modifiées. Si ces dernières ne s'avèrent pas efficaces, l'optimisation par ingénierie des enzymes représente un moyen pour développer de nouveaux variants enzymatiques. Des études récentes ont montré que la sélection *in vitro* d'enzymes permettrait d'identifier des polymérases qui seraient capables de générer des systèmes d'amplification artificiels⁵⁵. Pour atteindre ce but, il faut produire des polymérases qui soient capables de copier une matrice ADN en XNA et une XNA-reverse transcriptase qui permettrait de générer de l'ADN à partir de candidats XNA sélectionnés *in vitro*. Pinheiro et coll.⁵⁵ ont travaillé sur le développement de polymérases capables de synthétiser des polymères XNA, la stratégie de sélection adoptée étant appelée « Compartmentalized self tagging ».

Six systèmes XNA ont été explorés : les HNA (1,5- anhydrohexitole nucleic acids), CeNA (cyclohexenyl nucleic acids), (ANA arabinonucleic acids), FANA (2'-fluoro-arabino-nucleic acids) et les TNA (α -L-threofuranosyl nucleic acid). Les auteurs ont sélectionné des XNA-polymérases et des RT-XNA. Pour les six polymères étudiés, ils ont utilisé l'un de leurs systèmes d'enzyme pour sélectionner des aptamères modifiés. Il ont choisi le système HNA-polymérase/HNA-RT polymérase pour réaliser deux sélections dirigées contre deux cibles différentes : un acide nucléique, l'élément ARN TAR et une protéine, le lysozyme.

Après 8 tours de sélection/amplification, des aptamères HNA ont été sélectionnés ; un est capable de reconnaître l'ARN TAR avec un K_D de 28-67 nM et un autre est capable de reconnaître le lysozyme avec un K_D de 107-141 nM. Cette étude a montré clairement le potentiel de la sélection *in vitro* à adapter la diversité chimique pour générer une diversité phénotypique. Elle constitue une introduction vers des systèmes d'évolution *in vitro* personnalisés adaptés à des fonctions spécifiques.

6. Exemple d'application d'aptamères : développement de biocapteurs

6.1 Introduction

L'exploitation du potentiel de reconnaissance moléculaire des acides nucléiques remonte à la fin des années 1960, quand la première hybridation *in situ* a été mise au point⁵⁶. La reconnaissance moléculaire est basée sur les interactions de type Watson et Crick, l'ADN complémentaire à la séquence cible est radiomarquée, permettant ainsi la localisation de fractions d'ADN d'intérêt au niveau de la cellule. En se basant sur le même principe de reconnaissance, Tyagi et coll.⁵⁷ avaient décrit en 1995 le

développement de balises moléculaires, capables de transduire le signal de reconnaissance sous forme d'un signal détectable.

Ces balises sont structurées sous forme d'une tige boucle, les extrémités 5' et 3' sont respectivement marquées par un fluorophore EDANS : (2-Aminoethyl amino naphthalene-1-sulfonic acid) et un « quencher » dabcyI :

(4-((4(diméthylamino)phényl) azo)benzoic Acid) ; la proximité de ces deux molécules provoque l'extinction du signal de fluorescence.

La boucle est formée par la séquence complémentaire à la cible, l'hybridation de ces deux dernières provoque la dissociation du duplex et l'éloignement du fluorophore du quencher ayant pour conséquence la restauration du signal de fluorescence (voir la figure 8).

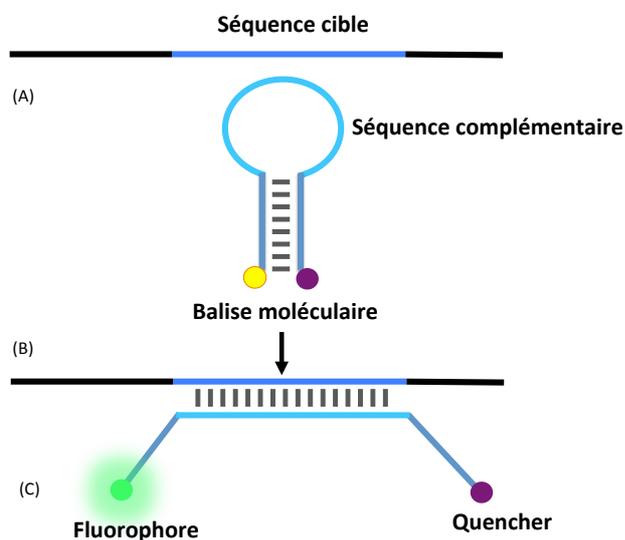


Figure 8 : Balise moléculaire

(A) La séquence cible est reconnue par la séquence complémentaire localisée sur la boucle ; (B) les deux séquences s'hybrident et provoquent la dissociation du quencher et du fluorophore ; (C) l'émission du fluorophore est restaurée.

La stratégie adoptée pour le développement des balises moléculaires a permis d'associer l'évènement de reconnaissance moléculaire et celui de l'émission d'un signal détectable. En effet, la liaison à la cible induit un changement de conformation qui serait capable d'altérer les propriétés spectroscopiques du système « quencher »/fluorophore, permettant ainsi de mesurer en temps réel la formation des complexes.

D'autres types d'acides nucléiques tels les aptamères sont capables d'adopter une conformation structurale indispensable⁵⁸ à la reconnaissance de plusieurs groupes moléculaire⁵⁹. Ces derniers pourraient être exploités pour le développement de biocapteurs pour la détection de cibles différentes des acides nucléiques tout en adoptant le principe de changement de conformation induit par la cible précédemment décrit pour les balises moléculaires.

6. 2 Développement de biocapteur à partir d'aptamères

La conversion d'un aptamère en biocapteur se fait par deux moyens : le premier est basé sur la conversion d'un aptamère dont la structure et le motif de reconnaissance sont identifiés, appelé « conception rationnelle » ; le second est basé sur la sélection sur critère de reconnaissance et d'émission de signal et/ou sur une propriété intrinsèque des oligonucléotides (ex. : changement de conformation), qui va contribuer ultérieurement à rapporter un signal de reconnaissance significative. Ces deux stratégies seront abordées dans les sections suivantes.

6. 3 Conception rationnelle : modification post SELEX

On distingue plusieurs types de biocapteurs selon le système de détection utilisé et la conception de ce dernier, le classement ci-dessous est basé principalement sur le type d'architecture utilisé. On distingue 3 grandes familles : les systèmes mono-mère, les systèmes bi/multi-mères et les systèmes chimériques. Les systèmes de détections associées aux aptamères quels que soient leur type de conception sont soit monochromophores soit bichromophores.

A) Les systèmes monomères

Ces systèmes incluent tout les biocapteurs formés d'une séquence unique intégrant le système de détection et toutes les modifications requises. L'un des exemples est représenté par la conversion des aptamères anti-adénosine ARN¹⁹ et ADN⁶⁰ en biocapteurs⁶¹, cela est réalisé par l'incorporation d'un fluorophore (acridine ou fluorescéine) à des positions proches du site de fixation de l'adénosine ; des variations de fluorescence de 25-45 % sont mesurées en présence de la cible⁶¹. Lorsque le fluorophore (fluorescéine) est incorporé à l'extrémité 5' de l'aptamère, la variation du signal mesurée est faible, inférieure à 5 %. Les biocapteurs anti-adénosine ARN et ADN développés sont hautement spécifiques, le changement de l'intensité de fluorescence est observé exclusivement en présence de la cible, une altération de l'affinité est observée, les constantes de dissociation sont supérieures à celles des aptamères natifs anti-adénosine ADN et ARN, mais elles restent du même ordre de grandeur (micromolaire)⁶¹.

Un autre exemple est représenté par l'aptamère anti-thrombine (TBA), il représente l'un

des modèles les plus étudiés pour le développement de stratégies de conception rationnelle de biocapteurs.

Le TBA a été sélectionné³⁹ à partir d'une banque ADN, le motif de reconnaissance est composé de 15 nucléotides 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3', la structure est caractérisée par RMN⁶², il s'agit d'un ADN G-quadruplex unimoléculaire composé de deux quartets liés par deux boucles TT et une TGT. Cet aptamère est capable d'inhiber *in vitro* la coagulation sanguine en présence de fibrinogène ou de plasma humain à des concentrations nanomolaires³⁹.

Le TBA a été initialement converti en biocapteur⁶³ par marquage à la fluorescéine, ensuite immobilisé sur une lamelle de verre. La thrombine en solution est spécifiquement détectée en mesurant la polarisation de fluorescence de l'aptamère immobilisé, la constante de dissociation calculée est de 1,1 μM , soit 10 fois plus élevée que le TBA non marqué, montrant ainsi une altération de l'affinité de l'aptamère.

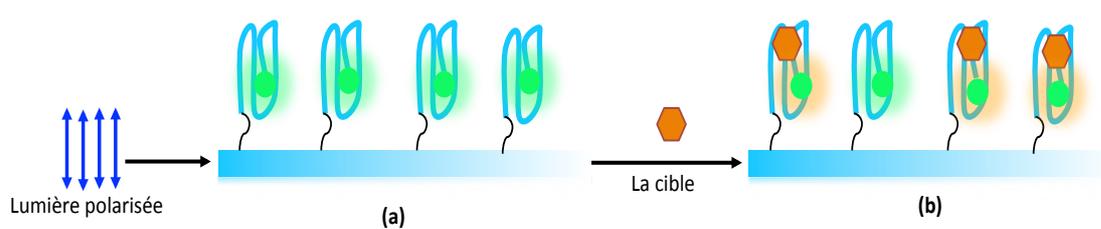


Figure 9 : Biocapteur monochromophore

A) Immobilisation du TBA marqué à la fluorescéine et excitation avec une lumière polarisée ; B) en présence de la cible, une polarisation de fluorescence a été mesurée.

Pour développer un biocapteur avec de meilleures propriétés, le même laboratoire avait opté pour la conversion du TBA en aptamère balise moléculaire (MB-aptamère) en utilisant un système bichromophore (« quencher » /fluorophore). L'avantage de ce système de détection est principalement basé sur le facteur du changement du signal de fluorescence, qui est supérieur à celui du système monochromophore ; cependant, la limitation de ce système est liée aux contraintes structurales, car l'organisation de l'aptamère ne permet pas essentiellement le positionnement désiré du système fluorophore/ « quencher » en présence et en l'absence de la cible.

Dans le cas de l'aptamère anti-thrombine, la stratégie adoptée pour générer un TBA-BM⁶⁴ consistait en l'introduction d'éléments qui permettraient l'organisation du TBA-BM en tige boucle en l'absence de la cible, et en présence de cette dernière l'équilibre serait déplacé vers la conformation initiale en G-quadruplexe³⁹, la figure ci-dessous

montre la stratégie adoptée.

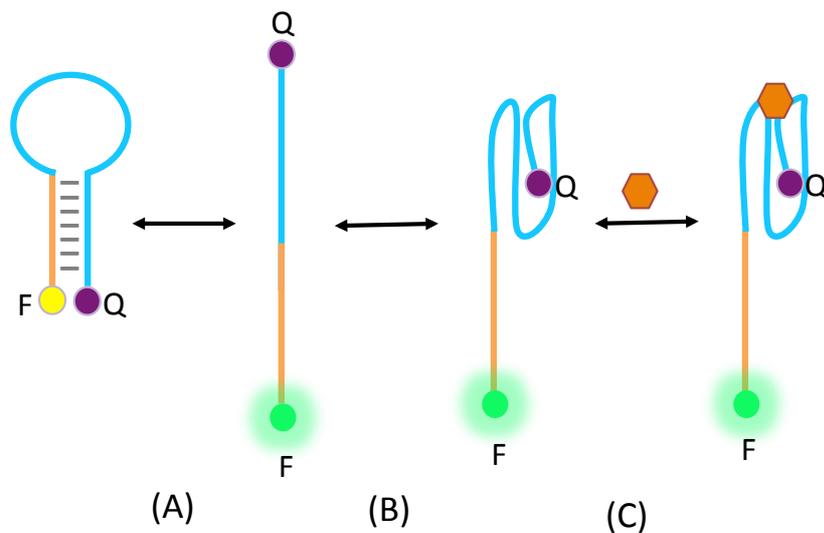


Figure 10 : Conversion de l'aptamère TBA en aptamère balise moléculaire

Une séquence complémentaire à la partie 5' du TBA a été insérée sur l'extrémité 3', l'aptamère forme une structure en tige boucle en l'absence de la cible (A) ; la structure en tige boucle est en équilibre avec la conformation active du TBA ; la présence de la cible permet de déplacer l'équilibre vers la conformation en G-quadruplex (B et C), permettant de mesurer une augmentation du signal de fluorescence.

Les résultats obtenus ont montré que la présence de la cible induit l'augmentation du signal de fluorescence d'un facteur 2,5. L'affinité de l'aptamère n'est pas affectée par les modifications introduites, le K_d mesuré est de 10 nM. Cependant, la spécificité de ce dernier est fortement affectée ; une augmentation du signal de fluorescence a été observée suite à l'ajout d'autres protéines qui partageaient 37% d'identité avec la thrombine⁶⁴.

B) Conception de biocapteurs multi-mères

Cette stratégie est basée principalement sur la capacité d'un aptamère à adopter deux conformations différentes, un duplexe en présence d'une séquence complémentaire et un complexe en présence de la cible d'intérêt.

Le premier modèle d'aptamère balise moléculaire a été conçu en utilisant un design multi-mères, il s'agit de l'aptamère balise moléculaire de la protéine Tat du HIV humain de type 1 (Tat-MB)⁶⁵. L'aptamère anti-Tat est organisé en tige boucle⁶⁶ comportant deux motifs de reconnaissance identiques, similaires à celui retrouvé dans le TAR-1 ARN du

virus du HIV. La conversion de ce dernier en balise moléculaire est représentée par la figure II.

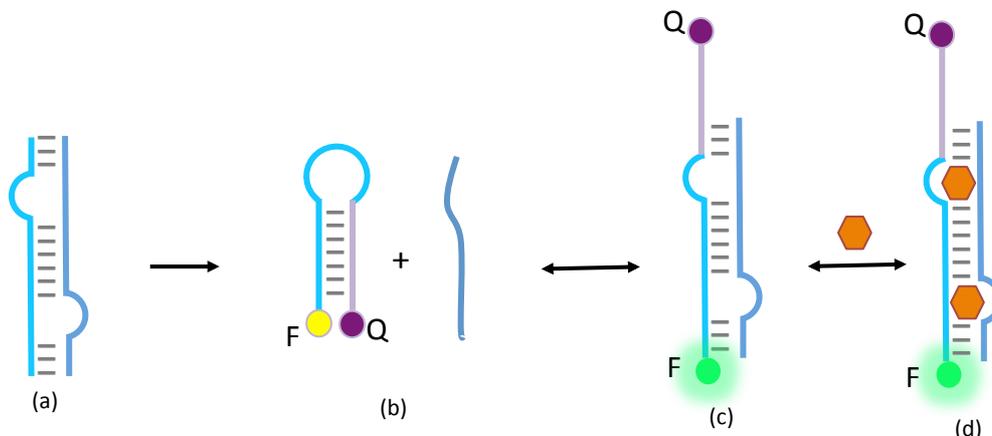


Figure II : Stratégie de conception d'un biocapteur à partir de l'aptamère anti-Tat

Deux oligomères sont générés par clivage de la boucle apicale de l'aptamère anti-Tat (a), l'un d'eux est allongé par une séquence complémentaire et forme une structure en tige boucle marquée par un « quencher » et un fluorophore sur les extrémités 3' et 5' respectivement (b). La présence de la cible favorise la dissociation du duplexe et l'association des deux oligomères, et par conséquent la restauration du signal de fluorescence (c, d).

A une concentration de 200 nM en la protéine Tat, le signal de fluorescence rapporté par le Tat-BM augmente d'un facteur 14. Ce dernier est considéré comme l'un des meilleurs aptamères balises moléculaires générés par la stratégie du « design » rationnel. La structure native de l'aptamère anti-Tat est favorable à la stratégie de conception adoptée.

Les stratégies présentées ne peuvent pas être généralisées sur d'autres aptamères, car elles sont spécifiques aux aptamères initiaux. La prédiction du design qui pourrait être adopté pour chaque type de biocapteurs n'est pas aisément accessible. De ce fait, de nouvelles études⁶⁷⁻¹²⁷ sont apparues pour développer une approche universelle pour le développement Apta-BM.

Nutiu et coll.⁷⁰ ont rapporté un design qui pourrait être adopté pour différents types d'aptamères. Comme pour le Tat-BM, le fonctionnement de ce dernier repose sur sa capacité à former soit un duplexe avec un ADN anti-sens soit un complexe avec la cible, d'où le nom de « switching aptamère ». La particularité de ce dernier est liée au fait que le design global du système de détection (fluorophore/ « quencher ») est indépendant de la nature de la conformation initiale de l'aptamère ; la figure 12 montre le design du

biocapteur.

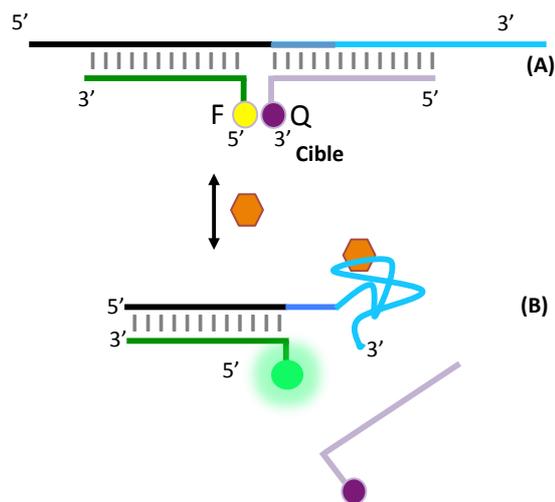


Figure 12 : Stratégie de conception tripartite du switching aptamère

A) Un ADN antisens comportant un DABCYL en 3' (QADN) est complémentaire de la séquence de l'aptamère incluant en partie une séquence additionnelle qui prolonge ce dernier à son extrémité 5'. Un ADN antisens marqué à la fluorescéine en 5' est partiellement complémentaire de la séquence additionnelle ; en l'absence de la cible, le FADN est positionné à proximité du QADN, provoquant l'extinction du signal de fluorescence. (B) La présence de la cible induit la formation du complexe cible/aptamère-FADN et par conséquent la dissociation du duplexe QADN/aptamère-FADN et la restauration du signal de reconnaissance.

L'aptamère anti-ATP et le TBA ont été utilisés comme modèles pour valider cette stratégie, les séquences des deux aptamères ont été introduites dans les systèmes triplex. Les « switching » aptamères générés anti-ATP et anti-thrombine ont gardé la spécificité des aptamères initiaux ; cependant, l'affinité de ces derniers est altérée, cela pourrait être attribué à l'occupation du site de fixation des deux cibles par une séquence complémentaire. L'altération de l'affinité est plus importante pour l'aptamère anti-ATP, dont le K_d augmente d'un facteur 60 par rapport à l'aptamère anti-thrombine, dont le K_d augmente d'un facteur 2. Dans le cas des deux aptamères balises moléculaires, le signal de fluorescence augmente d'un facteur égal ou supérieur à 10, permettant de situer cette stratégie en termes de détection parmi les plus optimales.

C) Les systèmes chimériques

Les systèmes biocapteurs chimériques sont représentés par des plateformes composées aux moins de deux aptamères, l'un des deux jouerait le rôle de module de reconnaissance (module-R), le second jouerait un rôle dans l'émission du signal (module-S), ces deux modules structuraux seront associés via un 3^e module (module-T) qui assurerait la connexion entre le module-R et le module-S et qui jouerait un rôle dans la transduction du signal de reconnaissance en un signal détectable.

La sélection d'aptamères sur critère de reconnaissance moléculaire est assez fréquente, cependant, le développement des systèmes biocapteurs chimériques requiert le développement d'aptamères ayant la capacité de potentialiser l'émission et/ou la transduction du signal. Actuellement, le développement de plateformes chimériques s'oriente principalement vers le développement d'aptamères qui auront un rôle dans la signalisation (module-S) ou dans la transduction du signal (module-T).

C1) Développement d'aptamères comme module de signalisation

La sélection d'aptamères pour l'émission d'un signal est illustré par l'ARN liant le 3,5-difluoro-4-hydroxybenzylidene imidazolinone (DFHBI)⁷¹ communément appelé « Spinach ». En solution, le DFHBI effectue des mouvements intramoléculaires induisant l'extinction du signal de fluorescence, l'interaction avec l'aptamère Spinach permet d'établir des interactions spécifiques qui vont induire la réduction du mouvement intramoléculaire, et par conséquent la restauration du signal de fluorescence.

La génération de biocapteurs chimériques a été réalisée en fusionnant via un module-T le Spinach ARN (module-S) aux aptamères⁷² ou riboswitch⁷³ (module-R). Le schéma ci-dessous montre le « design » du biocapteur généré.

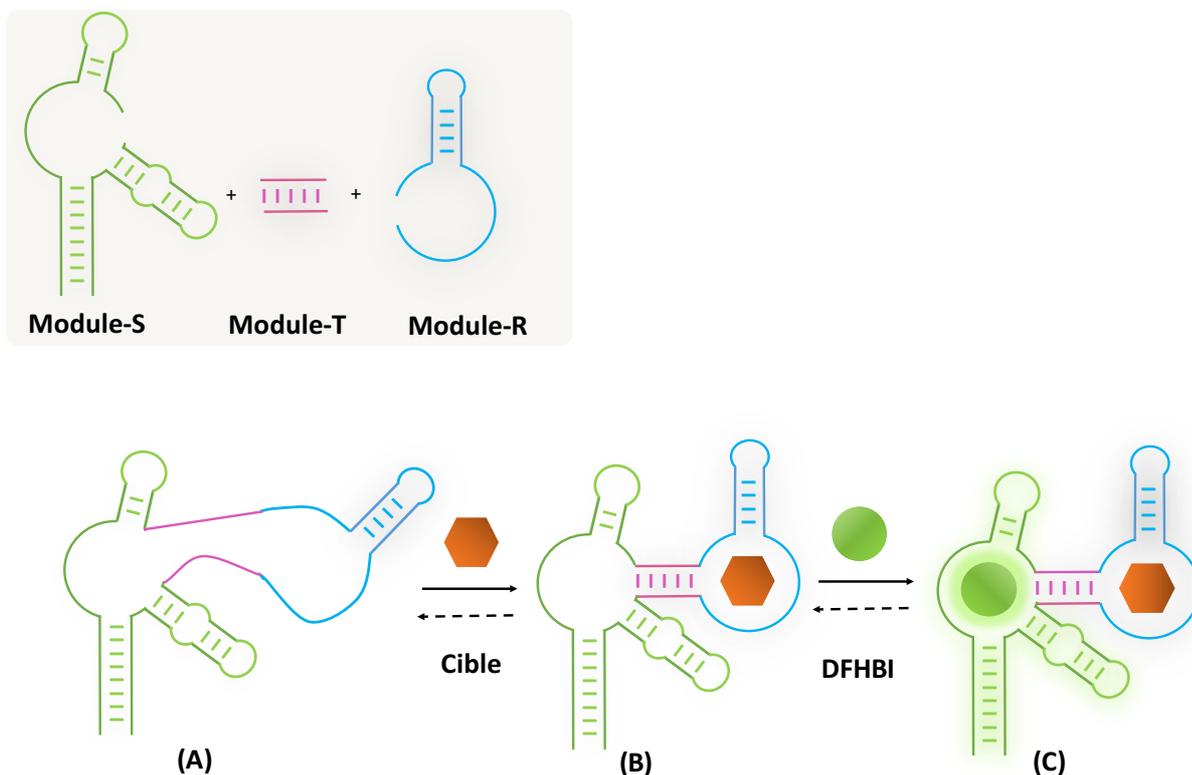


Figure 13 : Système⁷² biocapteur chimérique développé à partir de l'aptamère ARN « Spinach ». En l'absence de la cible, les deux brins formant le module-T ne s'hybrident pas (A) ; la liaison de la cible au module-R favorise la stabilité de formation du duplexe, et par conséquent la formation de la conformation active du module-S (B) ; le DFHBI se lie au module-S, induisant l'émission d'un signal de fluorescence (C).

Les biocapteurs optimaux développés⁷⁴ pour la reconnaissance de l'adénosine, de l'adénosine 5'-diphosphate (ADP) et du S-adénosylméthionine, guanine et GTP ont respectivement un facteur de fluorescence qui augmente de 20, 20, 25, 32 et 15 en présence des cibles moléculaires (*in vitro*) à des concentrations saturantes.

L'affinité de ces biocapteurs est analysée en utilisant le paramètre EC_{50} ⁷², celui-ci est représenté par la concentration de ligand maximale nécessaire pour l'activation de la moitié des biocapteurs, elle est indiquée comme une valeur relative au K_d , mais pas nécessairement identique. Pour la plupart de biocapteurs développés, l' EC_{50} est supérieur au K_d de l'aptamère natif, par exemple, dans le cas du biocapteur ADP, l' EC_{50} est estimé à 270 μM , il est 90 fois supérieur à la constante d'affinité de l'aptamère natif. L'un des paramètres importants à prendre en compte pour le développement de biocapteurs pour la détection de métabolite dans la cellule est la concentration intracellulaire de ce dernier ; en effet, pour le biocapteur ADP, l' EC_{50} est inférieure à la

concentration intracellulaire de la même molécule, et par conséquent l'utilisation de ce dernier pour l'imagerie de la dynamique de l'ADP chez *E.coli* est réalisée avec succès⁷².

C2) Développement d'aptamères comme module de transduction de signal

La transduction au niveau cellulaire constitue un événement moléculaire essentiel à la survie, il permet de déclencher une réponse « événement en aval » à un événement en amont présenté essentiellement par la détection d'une signature moléculaire particulière ou un stimuli externe. L'un des exemples illustrant bien ce mécanisme, ce sont les riboswitchs, la liaison du métabolite à l'élément de reconnaissance (la partie aptamère) représente l'événement initial, celui-ci va induire un changement de conformation qui va induire à son tour l'altération en aval de l'expression d'un gène qui code pour une protéine qui est impliquée dans la voie de biosynthèse du même métabolite, induisant ultimement l'inhibition de la synthèse du même métabolite. Les riboswitchs sont décrits comme étant primitifs et faisant partie des premiers processus métaboliques appartenant au monde ARN⁷⁵. Le principe du fonctionnement du biocapteur chimérique précédemment décrit⁷² mime en principe le fonctionnement du riboswitch où les 3 fonctions (reconnaissance, transduction, réponse) font partie des propriétés intrinsèques d'une molécule unique l'ARN.

Les systèmes cellulaires contemporains édifiés sur une diversité moléculaire considérable disposent de voies de signalisation/régulation complexes constituées d'une cascade d'interactions bi ou multimoléculaires incluant plusieurs partenaires moléculaires (petite molécule/protéine, protéine/protéine, protéine/acide nucléique et/ou acide nucléique/acide nucléique)⁷⁶. Le remaniement de structure observé au niveau des systèmes de régulation unimoléculaire (riboswitch) constitue un événement secondaire, en effet, l'événement de la transduction est initié par des interactions spécifiques entre deux motifs structuraux.

L'application de la transduction spécifique pour le développement de plateforme chimérique représente un avantage pour une application dans le cadre d'une détection multiple, mais aussi pour une régulation multiple en utilisant des aptamères de type effecteur.

C3) Le développement d'aptamère comme module de transduction spécifique

Les modules de transduction spécifiques (module-TSP) requièrent au moins deux motifs structuraux ARN capables de former spécifiquement un complexe avec une haute

affinité. L'un des deux motifs serait associé au module-R et le second au module-S, la liaison de la cible moléculaire va induire la formation du complexe entre les deux modules-TSP, et induire en amont l'émission d'un signal mesurable. Le rôle de la structure tertiaire des ARN naturels dans la régulation est précédemment présenté par les ARN viraux liant la protéine gp43 du bactériophage T4¹¹ et l'ARN TAR liant la protéine Tat⁷⁷, ces motifs pourraient être exploités comme module-TSP, si des aptamères liant spécifiquement ces motifs sont identifiés. Un aptamère ARN anti-TAR est sélectionné⁷⁸, celui-ci est organisé en tiges-boucles, la boucle apicale de ce dernier forme un complexe avec la boucle apicale de l'ARN TAR du HIV-1, le complexe « kissing » ainsi formé a une constante de dissociation de 30 nM.

Au niveau biologique, les interactions boucle-boucle sont identifiées principalement chez les virus. Dans le cas du virus de la leucémie murine de Monley (MMLV)⁷⁹ le complexe « kissing » est essentiel pour la dimérisation du génome viral ; des interactions hydrogènes (Watson et Crick) et des interactions de type « stacking » sont essentielles pour la stabilité des interactions boucle-boucle. Ces dernières sont aussi identifiées chez des ARN d'*E. coli*⁸⁰, impliqués dans la régulation du nombre de copies du plasmide ColE1.

Un complexe « kissing » RNA est récemment exploité pour le développement de biocapteurs⁸¹ (figure 14). Les aptamères anti-GTP⁸² (ARN) et anti-adénosine⁶⁰ ont été utilisés comme des modules-R. Le module-TSP est représenté par deux ARN formant un complexe « kissing » KC24 et KG51 (Figure 15).

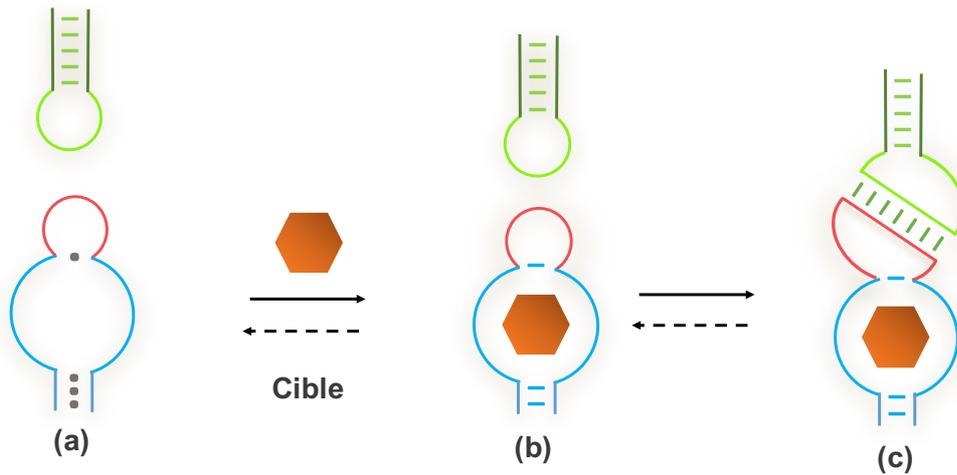
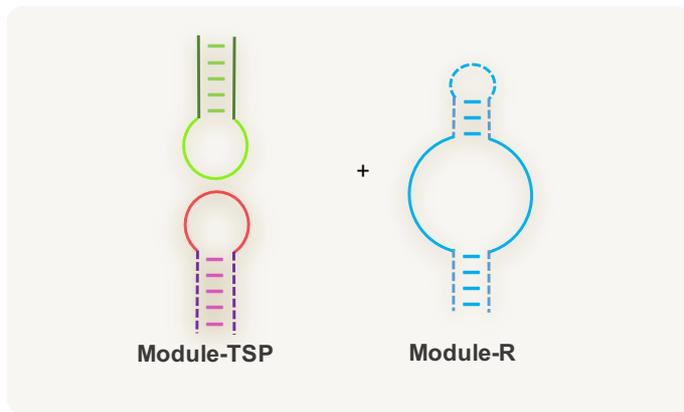


Figure 14 : Conception de biocapteurs basée sur la transduction spécifique⁸¹

En l'absence de la cible, les aptamères tronqués (a) ne seraient pas structurés et par conséquent les complexes « kissing » ne se formeraient pas. En présence de la cible moléculaire (b), les aptamères se structureraient en tige boucle et permettrait la formation d'un complexe « kissing ».

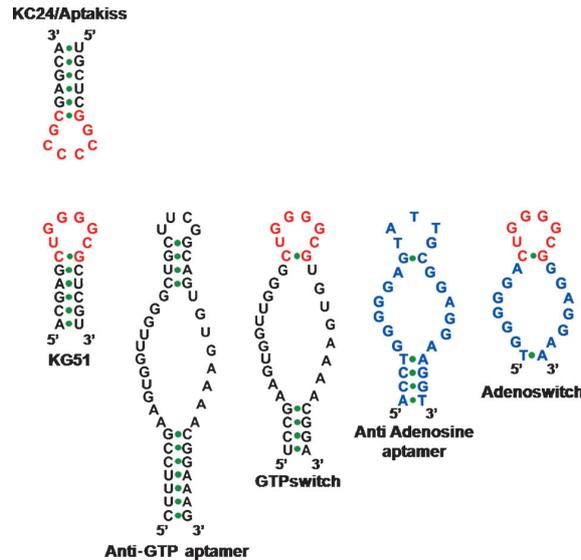


Figure 15 : Système biocapteur chimérique développé à partir de complexes « kissing » KC24 et KG51⁸¹.

Les aptamères anti-GTP et anti-Adénosine ont été utilisés comme des modules-R, les boucles apicales des deux aptamères ont été remplacées par la boucle apicale du KG51. Le nombre de bases formant les duplexes stabilisant les structures des aptamères initiaux a été réduit.

Les résultats obtenus ont montré que la formation du complexe « kissing » est essentiellement dépendante de la présence des cibles moléculaires (ATP et GTP). Le remplacement du GTP par l'ATP et de l'ATP par l'inosine altère la formation des interactions boucle-boucle, le même résultat est observé si des mutations sont introduites au niveau de la boucle apicale des aptamères.

La stratégie présentée a montré la possibilité d'appliquer la transduction spécifique au développement de biocapteurs, la liaison de la cible moléculaire au module-R induit la formation spécifique d'un complexe « kissing » entre les deux ARN formant le module-TSP. Cette stratégie pourrait être appliquée pour une détection multiple si d'une part des différents complexes « kissing » spécifiques sont exploités et d'autre part si le second ARN (KC24) est capable d'induire en amont une réponse moléculaire en association à un aptamère module-S.

II. Présentation et objectifs de la thèse

I. Contexte de l'étude

L'un des enjeux de la recherche spatiale en exobiologie porte sur la possibilité de détecter des marqueurs de chimie prébiotique (exemples : bases azotées et acides aminés) dans l'environnement martien. L'efficacité d'un outil de détection *in situ* repose sur sa capacité à reconnaître sa cible spécifiquement, mais aussi il doit être opérationnel dans les conditions environnementales, ainsi que celles imposées par la méthode d'analyse employée. Par conséquent, dans le cadre d'une application spatiale, l'outil de détection doit être autonome, automatisable, mais aussi résistant à la dégradation, à la variation de température, à la présence de méthanol utilisé lors de l'extraction et aux conditions environnementales telles les radiations cosmiques. L'un des axes de recherche du Centre national d'études spatiales, CNES, s'oriente vers le développement d'un outil permettant la détection *in situ* de marqueurs de chimie prébiotique ; ainsi, l'un des moyens choisis à cet effet est la technologie des micropuces.

Ces dernières consistent en des supports miniaturisés permettant l'immobilisation en parallèle de plusieurs molécules capables de transduire la reconnaissance moléculaire en un signal détectable (voir la section précédente), elles sont proposées comme un outil de choix pour une application spatiale¹⁰⁴.

I. I Application des biopuces à la détection sous des contraintes spatiales

De par leurs formats, les biopuces permettent une application automatisée ; la détection du signal à la surface de ces dernières dépend principalement du système biocapteur utilisé. Dans le cas par exemple d'un système de détection basé sur l'émission de fluorescence, la surface de la biopuce est soumise à un scan laser qui devrait être adapté à la nature du fluorophore utilisé. La qualité de détection moyennant d'une biopuce est associée à plusieurs paramètres, parmi eux : la spécificité de l'interaction cible / biocapteur ; la reproductibilité des essais et le ratio signal/bruit de fond (S/B)¹⁰⁵.

Pour valider une biopuce pour une application spatiale, il est essentiel d'étudier l'effet des contraintes spatiales citées ci-dessus, sur l'altération des paramètres qualitatifs de la biopuce.

Le Postollec et coll.¹⁰⁶ ont testé l'effet des radiations cosmiques sur un système biocapteur basé sur des anticorps. Les particules qui composent les faisceaux de radiation dans l'espace pourraient provoquer l'ionisation des atomes, l'altération des échantillons biologiques et l'altération du matériel électronique. Dans un premier temps, les radiations aux neutrons ont été testées, elles représentent l'espèce dominante

du spectre de radiation dans l'environnement martien. Ainsi, des anticorps secondaires marqués à un fluorophore ont été irradiés sur des microplaques HTATM (High-Throughput MicroArrayingTM). Ces dernières ont été décrites comme ayant une géométrie semblable aux biopuces appliquées dans les missions spatiales. Des molécules de fluorescéine ont été également irradiées indépendamment des anticorps ; la figure 16 montre le schéma de la stratégie expérimentale adoptée pour irradier les anticorps.

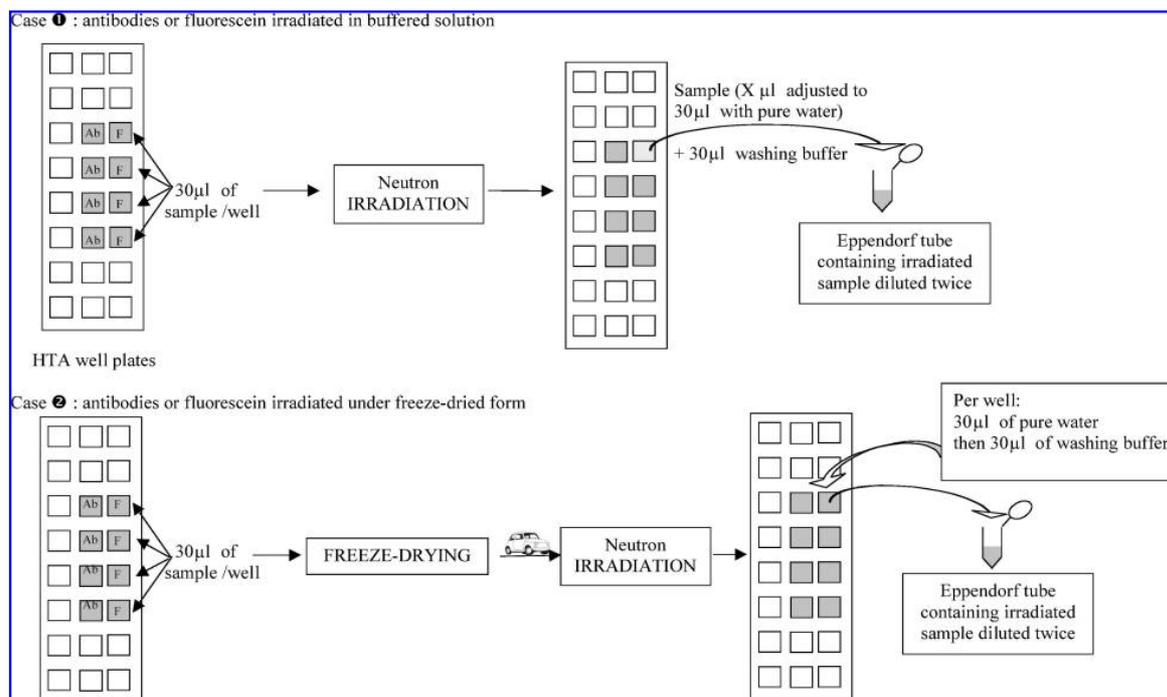


Figure 16 : Protocoles adoptés pour l'irradiation des anticorps et de la fluorescéine¹⁰⁶. Dans le premier cas, les anticorps et la fluorescéine ont été irradiés aux neutrons en solution ; dans le second cas, les échantillons ont été préalablement lyophilisés, ensuite irradiés. La lyophilisation représente l'un des paramètres requis pour le transport spatial, les molécules seraient réhydratées uniquement lors de la détection.

Ultérieurement, des testes fonctionnels sur les molécules irradiées ont été effectués, les résultats obtenus ont montré que les irradiations aux neutrons en solution n'affectent pas les propriétés fonctionnelles des deux molécules. Cependant, la lyophilisation préalable provoque une augmentation du bruit de fond, principalement dans le cas des anticorps, cela pourrait être attribué à l'altération irréversible de la structure tridimensionnelle des anticorps. D'autres essais d'irradiation ont été réalisés par la même équipe, cette fois, ils ont testé l'effet d'une irradiation aux protons¹⁰⁷ à des basses énergies, ces particules sont dominantes dans

les faisceaux de radiations cosmiques interplanétaires. Dans un premier temps, les auteurs ont testé l'effet de ces particules sur des anticorps, et aucune altération des propriétés de reconnaissance n'a été observée ; dans un second temps, le même type de radiations a été testé sur des aptamères ADN¹⁰⁸ ; de même, les propriétés de reconnaissance ne sont pas altérées, cependant, dans le cas des aptamères, l'étape de lyophilisation ne représente aucun effet sur le fonctionnement après la réhydrations. Les aptamères sont communément stockés sous forme lyophilisée et cela pourrait s'effectuer sur plusieurs années. Les acides nucléiques ADN sont connus pour leur résistance à la dégradation et leur capacité à se restructurer après une dénaturation thermique ou acide, contrairement aux autres biomolécules comme les protéines ; par conséquent, les aptamères représentent un outil de reconnaissance de choix pour une application spatiale.

2. But du projet de thèse

En plus de radiations cosmiques, la variation de température et la lyophilisation, nous avons précédemment évoqué la présence de solvants organiques d'extraction comme étant l'une des contraintes imposées par le programme de détection dans l'espace. A cet effet, le développement d'un aptamère fonctionnel dans ces conditions est essentiel pour un système de détection optimal.

Les aptamères sont généralement utilisés pour des applications biomédicales, et opèrent dans des solutions aqueuses adaptées à l'application dans les conditions physiologiques. Pour exploiter leur potentiel de reconnaissance et étendre leur application, il est nécessaire d'intégrer de nouvelles propriétés à ces molécules.

Le but du projet de thèse est de développer un aptamère capable de reconnaître un marqueur de chimie prébiotique « l'adénine » en présence de solvant organique. Le travail que nous présentons ici fait partie de l'effort de développement d'une biopuce pour la détection de molécules marqueurs de vie ; la figure 17 montre le but du projet.

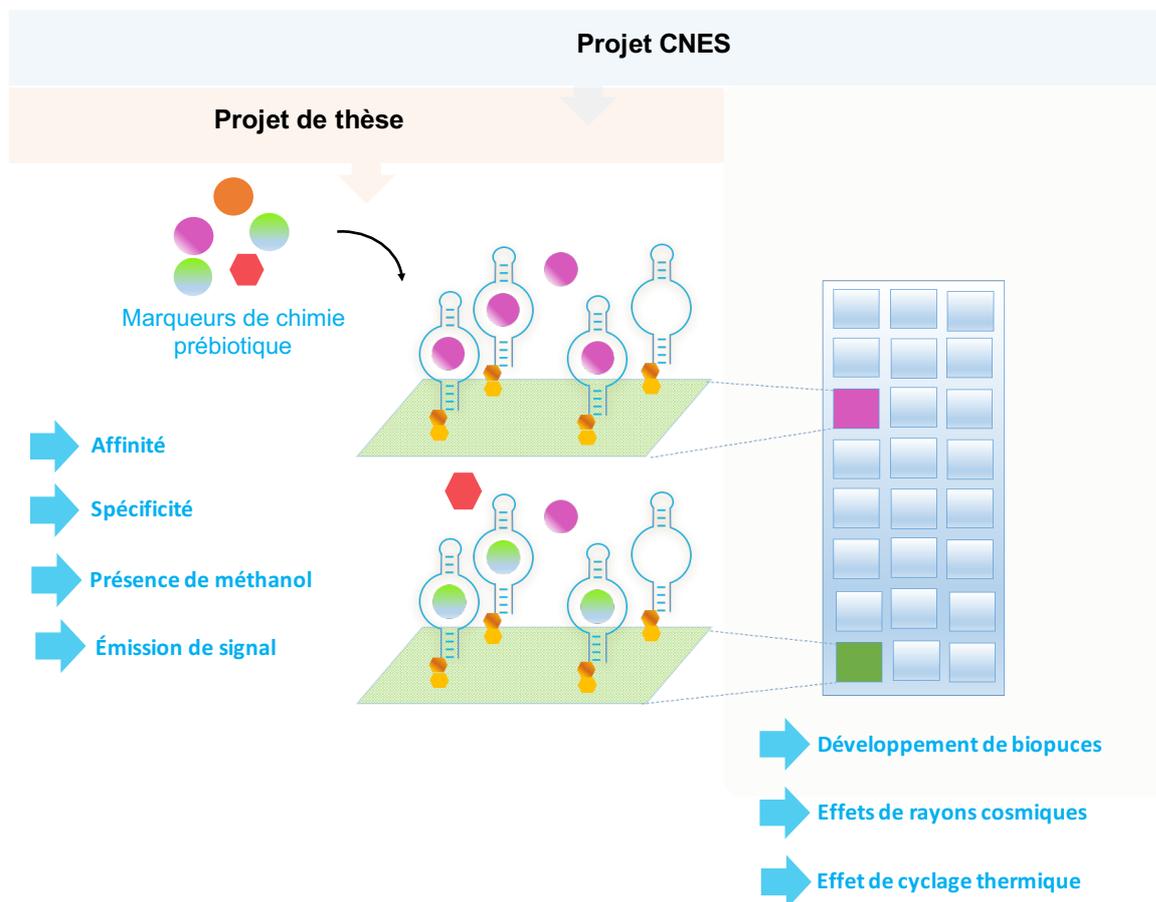


Figure 17 : schéma récapitulatif du projet CNES

2. 1 Limitation d'utilisation des aptamères en présence de solvants d'extraction

La présence de solvants organiques potentiellement utilisés pour l'extraction est considérée comme un facteur limitant. En effet, dans un milieu non aqueux ou partiellement hydraté, une désorganisation de la configuration en hélice est observée⁸³. De hautes concentrations en solvant organique (comme l'éthanol, le formamide, ou le DMSO) altèrent la structure de l'eau, provoquant une faible stabilité thermique du B-ADN et la transition vers une nouvelle conformation⁸³. L'effet dénaturant des solvants organiques comme les alcools augmente avec la longueur de la chaîne hydrocarbonée⁸³. Le méthanol est moins dénaturant que l'éthanol et le propanol, par conséquent souhaitable pour l'extraction avec des systèmes de détection incluant les acides nucléiques.

Quelques exemples existent dans la littérature sur des sélections effectuées en présence de solvant organique, l'intérêt consiste en la solubilisation d'une cible peu soluble en milieu aqueux. La concentration est souvent faible, inférieure ou égale à 10 % de solvant organique⁸⁴. L'un des rares exemples existants de détection de molécules après

extraction au méthanol est celui de l'aflatoxine B₁, extraite des échantillons de maïs en présence de 60 % de méthanol. L'aptamère anti-aflatoxine B₁ est sélectionné en milieux aqueux, tolère une concentration maximale de méthanol de 10 %, la dilution de l'échantillon d'un facteur 6 est requise avant de procéder à une détection avec l'aptamère.⁸⁵

Le développement d'aptamères qui seraient capables de reconnaître leur cible à des concentrations supérieures à 10 % permettrait de réduire le facteur de dilution après l'extraction, et par conséquent d'améliorer la sensibilité de détection. Pour cela, nous nous sommes basés principalement sur une sélection en présence de méthanol et sur l'introduction d'un nucléotide modifié comportant un groupement hydrophobe. Le développement d'un système de sélection *in vitro* qui tolère la présence de solvant organique repose sur l'adaptation technique des paramètres principaux qui composent ce système : la diversité, l'amplification et la sélection.

III. Résultats

I. Stratégie expérimentale

I. I La diversité : Introduction de nucléotides modifiés

Pour améliorer la solubilité des oligonucléotides dans le méthanol, nous avons choisi d'introduire un nucléotide qui comporte une modification chimique ayant des propriétés hydrophobes.

Le nucléotide modifié doit être adapté à la stratégie SELEX. Ce dernier doit être incorporé efficacement après chaque tour de sélection et sa présence ne doit pas être problématique ultérieurement pour les études de caractérisation.

Nous avons opté pour le 5-(octa1,7-diynyl)-2'-deoxyuridine (dODTP). Il comporte deux fonctions alcynes séparées par un bras à 4 carbones (Figure I8), ce substituant hydrophobe permet d'accroître la solubilité du nucléotide et des oligomères qui le contiennent dans les solvants organiques. On considère que le caractère hydrophobe apporté par ce nucléotide va contribuer à l'amélioration du comportement des candidats ADN au cours de la sélection dans un solvant contenant du méthanol.

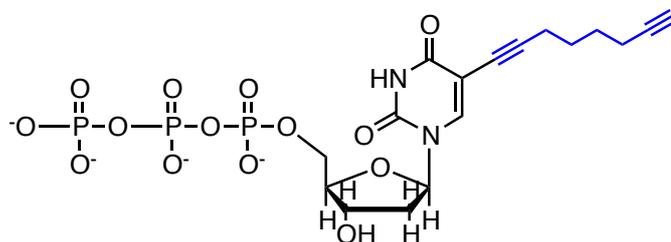


Figure I8 : 5-(octa1,7-diynyl)-2'-deoxyuridine (dODTP)

Avant de démarrer la sélection, il est nécessaire de préparer la banque incorporant le nucléotide modifié et d'évaluer la qualité d'incorporation du dODTP dans des conditions de sélection en présence de méthanol. La stratégie utilisée est abordée ci-dessous.

Nous avons choisi une production par amplification enzymatique à partir d'une banque matrice (Bm-Al). Cette dernière comporte une fenêtre aléatoire de 30 nucléotides et deux parties fixes nécessaires à l'activité de l'ADN polymérase utilisée pour l'amplification.

Dans la partie 5' fixe à la 20^e position, 6 synthons de type glycol propylène (C₃) sont incorporés. Cet espaceur n'est pas amplifiable par les ADN polymérases, et constitue

un point d'arrêt de la réplication, générant ainsi un brin complémentaire plus court qui constituera la banque de sélection (B-S). La figure 19 montre le schéma de la stratégie adoptée pour produire la banque initiale.

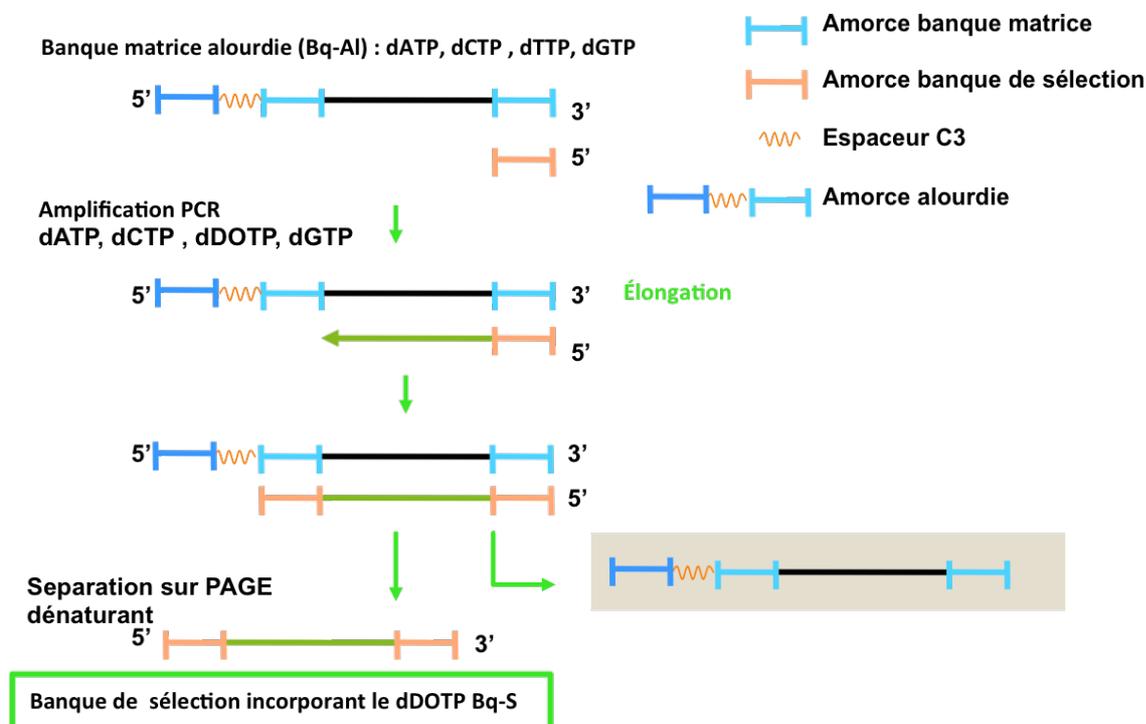


Figure 19 : Stratégie adoptée pour la production de la banque modifiée incorporant dDOTP

1. 2 Amplification : choix de l'enzyme adaptée à l'incorporation du nucléotide modifié

Le choix de l'enzyme est essentiel pour maintenir la même efficacité d'amplification et de sélection tout au long du SELEX. A cet effet, il faut choisir une enzyme capable d'incorporer correctement ce nucléotide. Des mises au point ont été nécessaires pour déterminer l'enzyme la plus adaptée pour incorporer le dODTP d'une part, et d'autre part tolérer la présence de méthanol.

Nous avons testé les enzymes dont nous disposons au laboratoire pour l'amplification d'une banque aléatoire non modifiée composée de molécules d'ADN, deux Taq ADN polymérases (famille A) qui proviennent de deux fournisseurs différents (NEB et Platinum) et une enzyme de la famille B, le vent exo - ADN polymérase.

Les PCR ont été réalisées en parallèle à des rapports différents en nucléotides ; dA:dC:dG:dOD (a) (10 :10 :10 :1), (b) (5 :5 :5 :1) et (c) (1 :1 :1 :1). La présence du dODTP à des concentrations inférieures à celles des autres nucléotides pourrait donner une indication sur la fidélité d'incorporation de ce dernier.

La figure 20 montre les profils de migration électrophorétique des produits de PCR sur gel d'agarose 3 %. La NEB Taq DNA polymérase (famille A) amplifie correctement en présence du dODTP, l'augmentation de concentration de ce dernier amène une augmentation de l'efficacité d'amplification. Contrairement à cette dernière, l'enzyme vent exo- appartenant à la famille B a une efficacité d'amplification qui diminue avec l'accroissement de la concentration en dODTP d'une part, et d'autre part l'efficacité d'amplification observée avec le plus faible rapport (10 :10 :10 :1) suggère que cette enzyme n'incorpore pas le dODTP d'une façon fidèle. La Taq ADN polymérase Platinum (famille A) n'incorpore pas efficacement le dODTP ; son efficacité est comparable à celle de la vent exo-.

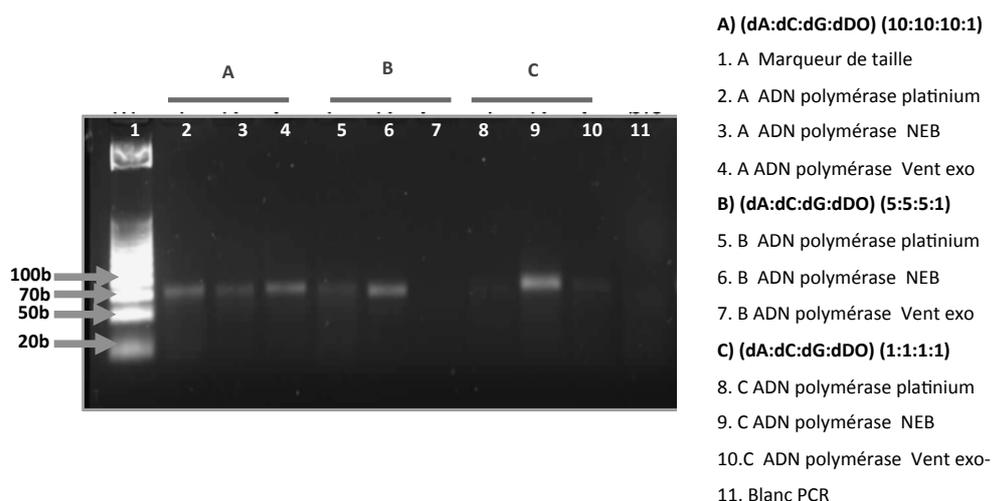


Figure 20 : Electrophorèse sur gel d'agarose 3 % des produits d'amplification PCR de la banque aléatoire ADN avec les différentes ADN polymérases pour les différents rapports de concentration de nucléotides triphosphates indiqués.

Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que l'incorporation efficace et fidèle du dODTP par une ADN polymérase n'est pas directement liée à l'appartenance à une famille spécifique. Les travaux de Carell et coll.⁸⁶ réalisés avec le même nucléotide ont montré que la Taq ADN polymérase n'était pas capable d'incorporer le dODTP, cela pourrait être lié aux conditions de tampon utilisées pendant de la PCR. Pour valider notre choix, nous avons testé une 3^e Taq ADN polymérase (Gold) en présence du dODTP ou du dTTP en parallèle avec la NEB ADN polymérase. Les produits

d'amplification PCR (figure 21) sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'acrylamide dénaturant 8 % (Figure 22).

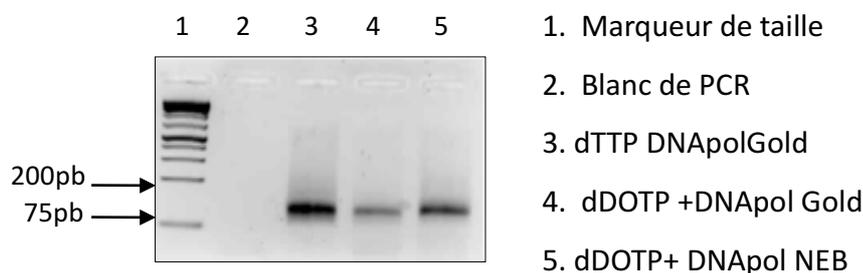


Figure 21 : Analyse électrophorétique des produits PCR de la banque d'ADN aléatoire sur gel d'agarose 3 %.

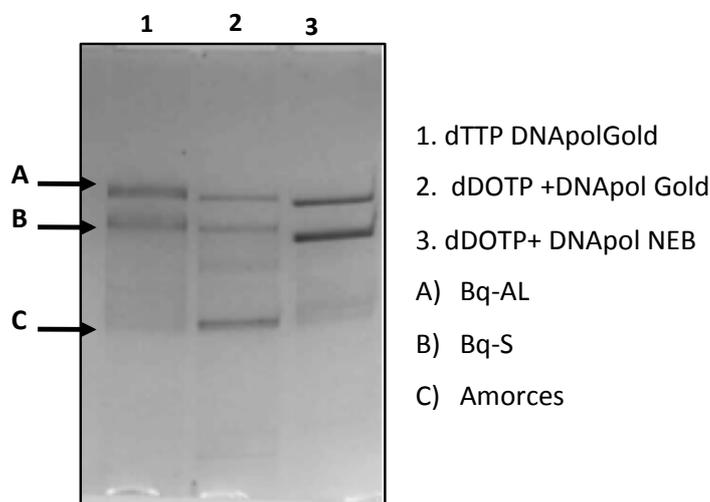


Figure 22 : Profil de migration de produits PCR sur PAGE dénaturant 8 %.

La NEB ADN polymérase est l'enzyme la plus efficace ; le profil de migration des produits d'amplification présente un retard de migration comparé aux produits de la PCR réalisée en présence du dTTP suggérant la présence de la modification dans les séquences amplifiées ; d'autre part, la bande correspondant aux amorces est de faible intensité comparée à celle observée dans le cas d'amplification avec la Gold ADN polymérase. Les Taq ADN polymérases ont la même structure, la même fidélité, mais pas la même efficacité (selon leur origine)^{87,88}. Ces enzymes ont été testées dans les mêmes conditions, mais nous n'avons pas assez de données structurales qui pourraient nous permettre d'expliquer les différences dans l'efficacité d'incorporation du dODTP, sachant que ces trois enzymes amplifient efficacement en présence des dNTP canoniques.

En accord avec l'étude réalisée par Carell et coll.⁸⁶, nous avons testé des Taq ADN polymérase incapables d'incorporer le dODTP, ou moins efficaces, mais cela ne permet pas de conclure sur l'inefficacité de cette famille d'enzymes.

Les travaux de Lee et coll.⁸⁹ ont montré que les Taq ADN polymérase pourraient être capables d'incorporer des nucléotides du type 2'désoxyuridine modifié en C5. Ils ont montré que les substituants comportant des groupements alkynyl rigides étaient incorporés par cette dernière, ils ont pu valider leur résultat par spectrométrie de masse.

La structure cristallographique des ADN polymérase montre que toutes les ADN polymérase sont capables d'accepter des modifications sur la position 5 des pyrimidines, car, au niveau du site actif de ces dernières, un espace est présent, tolérant la présence d'une modification. C'est pour cela que le choix de substitution sur la position 5 est privilégié. Les ADN polymérase ont des structures tridimensionnelles similaires, mais selon la nature des acides aminés présents au site actif, une modification sur une base nucléique peut être tolérée ou non pour l'incorporation.^{90,88}

En nous basant sur l'ensemble de ces informations et sur les résultats que nous avons obtenus, nous avons choisi d'utiliser la NEB Taq ADN polymérase pour la production de la banque et pour la réalisation du SELEX. Il reste à vérifier la tolérance de cette enzyme à la présence du méthanol.

Ultérieurement, nous avons testé l'effet de méthanol sur l'amplification après sélection en présence de méthanol. Ce dernier n'affecte pas l'efficacité de l'enzyme à amplifier la banque produite en présence du dODTP. La figure 23 montre le résultat obtenu : l'efficacité d'amplification reste optimale en présence de 25 % ou 50 % de méthanol (lors de la sélection), ces concentrations étant réduites à un dixième par dilution lors de la réalisation de la PCR.

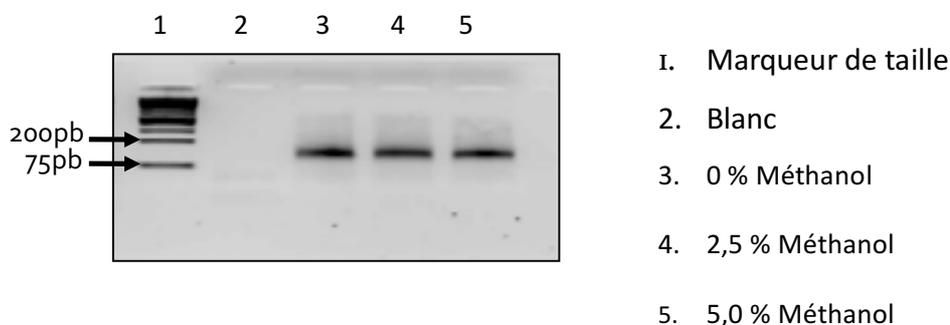


Figure 23 : Produit de PCR réalisées en concentrations croissantes de méthanol pendant la sélection.

La Taq ADN polymérase est choisie pour réaliser le SELEX, et pour les études ultérieures, elle incorpore efficacement le dODTP, et son efficacité n'est pas altérée par la présence de méthanol. Elle tolère des concentrations de méthanol allant jusqu'à 5 %.

1.3 La sélection

L'adénine est une molécule de petite taille de masse molaire 135 g/mol. Lors du processus SELEX, la capture des oligonucléotides en interaction avec l'adénine est rendue possible par son immobilisation sur des billes magnétiques : l'aimantation de ces billes permet de récupérer des oligonucléotides liant l'adénine à leurs surfaces. La réalisation de notre SELEX est basée sur ce principe. En effet, la banque ADN préalablement préparée est incubée avec des supports solides en l'absence de la cible, et cela dans le but d'éliminer les oligonucléotides non spécifiques. Les oligonucléotides récupérés à partir du surnageant sont incubés avec les billes adénine. Ces dernières sont lavées, les oligonucléotides en interaction avec l'adénine sont déplacés par la cible libre (l'adénine), la figure 24 montre le schéma de la stratégie adoptée.

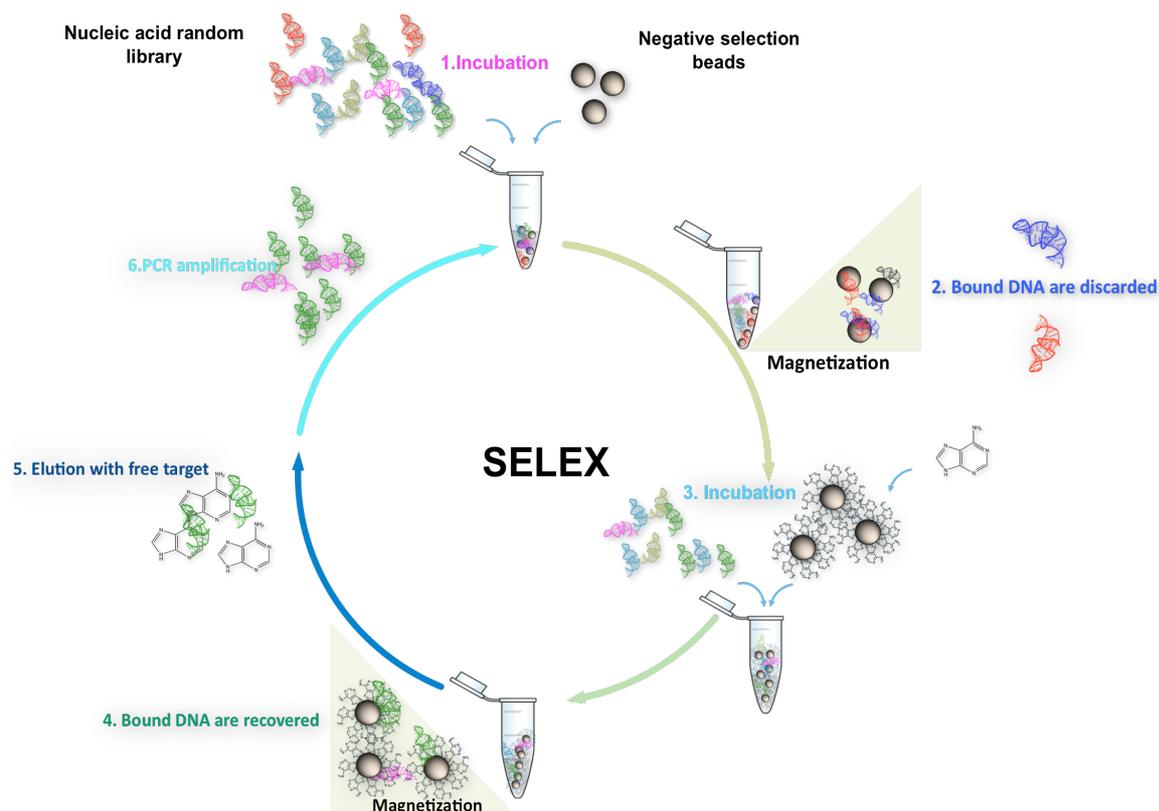


Figure 24 : Stratégie SELEX utilisée pour la sélection d'aptamères anti-adénine

1. 3. 1 Immobilisation de l'adénine à la surface des billes magnétiques

La préparation des supports d'affinité fonctionnalisés représente une étape clé pour la réalisation du SELEX dont dépend le succès de la sélection. Plusieurs paramètres doivent être pris en compte pour établir une stratégie d'immobilisation :

- Le choix de la position sur l'adénine pour l'introduction du lien ;
- Le choix d'un support adapté ;
- Le choix du lien.

A) Choix de la position de substitution sur la molécule d'adénine

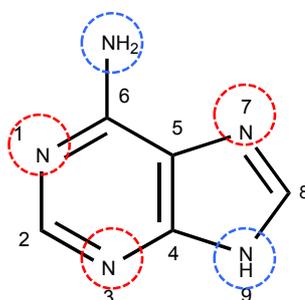


Figure 25 : Adénine

La structure ci-dessus représente la molécule d'adénine avec les différentes positions essentielles pour établir des liaisons hydrogènes. En bleu sont marqués les groupements donneurs de liaisons hydrogènes et en rouge les groupements accepteurs de liaisons hydrogènes. L'introduction d'un bras de greffage sur la molécule d'adénine ne doit pas interférer avec le réseau d'interactions potentielles que l'adénine pourrait développer avec les candidats oligonucléotidiques. Nous avons choisi la position 8 pour introduire un lien qui va permettre l'immobilisation à la surface des billes : un dérivé de l'adénine le 8-(octaI, 8-diynyl)-adénine est préalablement synthétisé à cet effet (voir l'article joint).

B) Choix du support

Nous avons choisi des billes magnétiques de petit diamètre (1 μm), porteuses de groupements carboxyliques : les billes Dynabeads[®] My One[™]. Les groupements carboxyliques peuvent former des liaisons amides avec une amine primaire. Cette liaison est stable en présence de méthanol.

C) Choix du lien

Eloigner l'adénine du support permet de contourner les problèmes liés à l'encombrement stérique. Nous avons choisi d'utiliser un lien bi-fonctionnel O-(2-Aminoethyl) -O'-(2-azidoethyl). L'amine va permettre l'interaction avec les billes carboxy et à l'autre extrémité le groupement azide va permettre de lier le 8 -(octa, 8-diynyl)-adénine.

I. 3. 2 Stratégie expérimentale

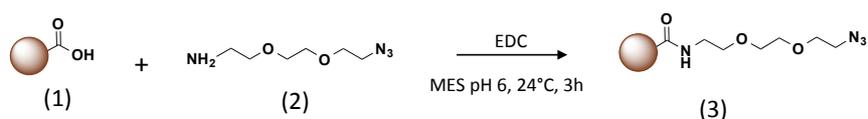
A) synthèse de billes de sélection

Formation de liaisons amides entre les groupements carboxyliques (billes) ayant une capacité de 600 nmoles/mg, activés par 10 équivalents de 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC), permettant le couplage en utilisant 10 équivalents du lien bifonctionnel contenant une amine primaire à l'une de ces extrémités. La réaction est réalisée dans le tampon MES à pH 6 pendant 3h à température ambiante (figure 26 A). L'adénine est ensuite immobilisée sur les billes saturées avec le lien par chimie « click »; la concentration d'adénine attendue à la surface des billes est de 100 μ M (figure 26 B). A la fin de la réaction de chimie « click », le surnageant des billes a été analysé par HPLC et cela dans le but d'évaluer le taux d'adénine non immobilisée à la surface des billes. La figure 27 montre le résultat obtenu.

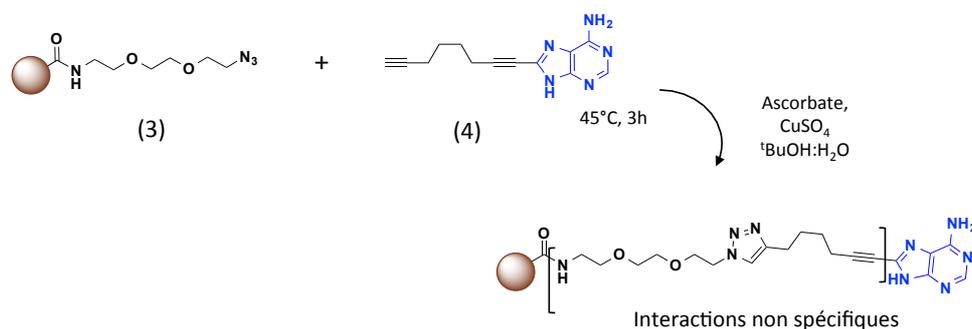
B) Synthèse de billes de contre-sélection

La réduction des interactions non spécifiques entre la banque d'oligonucléotides et le support est possible par l'addition d'une étape de sélection négative. Il s'agit d'utiliser les billes contenant le linker (en l'absence d'adénine), les oligonucléotides qui interagissent avec ces dernières sont éliminés. Celles-ci sont fonctionnalisées avec le même lien décrit ci-dessus en l'absence d'adénine (PEG-triazole-hexynyl). La figure 26 C montre la structure et la stratégie de synthèse de billes de contre-sélection.

A.



B.



C.

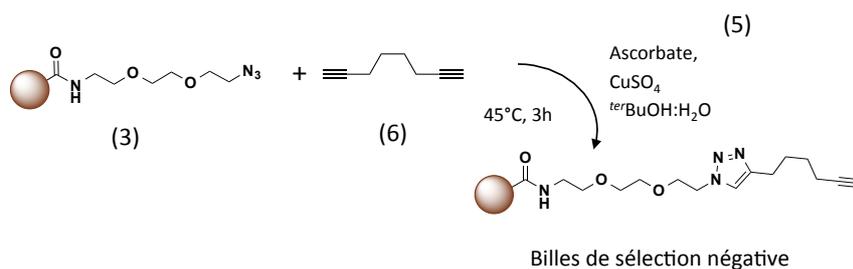


Figure 26

A) Saturation des billes carboxy (1) avec le bras bifonctionnel (2) permettant l'obtention de billes azides (3) ; B) Formation d'un triazole par réaction de cycloaddition de Huisgen entre l'alcyne du 8 -(octa, 8-diyne) -Adénine (4) est le groupement azoture à la surface des billes (3) ; C) Formation d'un triazole par réaction de cycloaddition de Huisgen entre l'octadiyne (6) et le groupement azoture à la surface des billes (3).

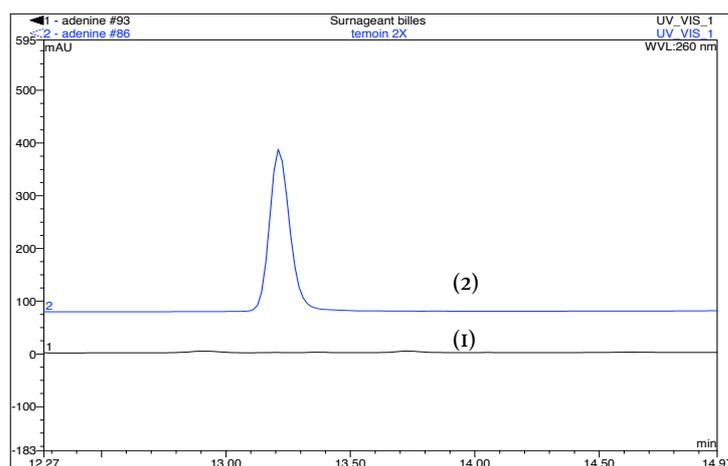


Figure 27: Evaluation de l'efficacité de l'immobilisation de l'adénine par chimie « click » à la surface de billes adénine « click ». 1) chromatogramme (noir) montrant le résultat obtenu après l'analyse du surnageant des billes après réaction de click. 2) chromatogramme (bleu) montrant le résultat obtenu après l'analyse du surnageant des billes contrôles (billes carboxy) après réaction « click ».

Le résultat obtenu montre l'absence de la molécule d'adénine dans le surnageant des billes fonctionnalisées avec le lien contenant la fonction azide, ce résultat suggère que l'adénine est immobilisée d'une façon efficace à la surface des billes.

C) Etude de la qualité des supports solide

Les billes de sélection négative sont utilisées afin d'évaluer la quantité d'ADN fixée en l'absence d'adénine et en présence de méthanol à des concentrations croissantes (0, 25 et 50 %).

Trois essais sont préparés en parallèle, 1 mg de billes est suspendu dans 100 μ l de tampon de sélection 1X (SLE) contenant du PBS 1X, 1 mM MgCl₂, 100 mM KCl : 0 %, 25 % ou 50 % de méthanol à une concentration en oligonucléotides de 5 μ M. Après incubation pendant 30 minutes, le surnageant est éliminé et les billes sont lavées deux fois avec 100 μ l de TPS 1X.

Les billes sont à nouveau suspendues dans 10 μ l d'eau milliQ, les oligonucléotides en interaction à la surface de ces supports sont élués par chauffage à 95 °C pendant 1 min puis quantifiés. La figure 28 représente le résultat obtenu.

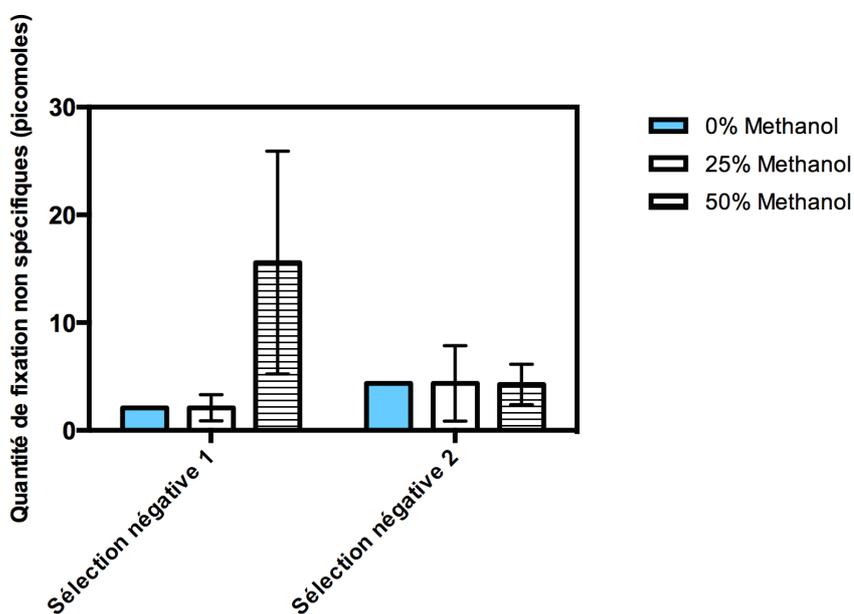


Figure 28 : Quantité d'ADN à la surface des billes contrôles en présence de concentrations croissantes en méthanol. Deux sélections négatives successives ont été réalisées sur le même échantillon de banque comportant le nucléotide modifié.

L'augmentation du pourcentage de méthanol provoque une augmentation des interactions non spécifiques qui peuvent avoir comme conséquence la perte de candidats oligonucléotidiques capables de reconnaître spécifiquement l'adénine. Nous avons testé la saturation du support avec d'autres groupements chimiques. La banque ADN 5 μM est incubée 30 minutes avec les billes magnétiques carboxy saturées avec :

- le bras azide + octadiyne, utilisé lors de la sélection négative ;
- le bras azide + adénine, utilisé lors de l'étape de sélection ;
- le bras azide seul ;
- l'éthanolamine ;
- le bras azide + l'éthanolamine

Après aimantation, le surnageant est éliminé et ce qui s'est fixé sur les billes est élué et dosé. Le protocole précédent est utilisé. Le tableau ci-dessous reprend les résultats obtenus pour chaque condition :

	125 pmol de banque ADN					
	0% MeOH	10% MeOH	25% MeOH	30% MeOH	40% MeOH	50% MeOH
50 μl billes bras azide + octadiyne	1,3 pmol	1,6 pmol	3,5 pmol	4,3 pmol	10,4 pmol	24,3 pmol
50 μl billes bras azide + adénine	1,4 pmol	/	/	/	/	45 pmol
50 μl billes éthanolamine	0,535 pmol	1,38 pmol	2,77 pmol	/	/	26,41 pmol
50 μl billes bras azide	0,477 pmol	0,492 pmol	0,234 pmol	/	/	23,28 pmol
50 μl billes bras azide + éthanolamine	1,28 pmol	0,477 pmol	0,231 pmol	/	/	22,57 pmol

Tableau 2 : Quantité d'oligonucléotides associés aux différents supports en concentrations croissantes en méthanol.

Quelle que soit la méthode de saturation des billes, la quantité d'oligonucléotides fixée sur les billes augmente avec la concentration de méthanol. Ainsi, à 50 % de méthanol, le bruit de fond observé est très élevé. Toutefois, à la concentration de 25 % de méthanol, la fixation non spécifique est acceptable avec environ 3,5 pmoles de banque fixées sur le bras azide + octadiyne, soit 3 %. Nous avons donc choisi d'effectuer la sélection en présence de 25 % de méthanol. En nous basant sur les conditions déterminées et les mises au point, 11 tours de sélection/amplification ont été réalisés à

25 % de méthanol. L'article joint présente les résultats de ce SELEX ainsi que les protocoles utilisés. L'étape suivante a été de mettre en œuvre une méthode permettant d'évaluer les candidats sélectionnés à l'issue du SELEX.

1. 4 Description des Méthodes d'évaluation post-SELEX

Classiquement, dans notre laboratoire, la résonance plasmonique de surface (SPR) est la méthode la plus utilisée pour effectuer des évaluations post-SELEX. Cependant, l'instrument disponible (BIAcore 3000) ne tolère pas la présence de méthanol à 25 %. Nous ne pouvons donc utiliser cette technique pour évaluer nos candidats.

Il a donc fallu avoir recours à des méthodes alternatives. Dans un premier temps, nous avons choisi d'utiliser les billes de sélection pour déterminer le taux de fixation à l'adénine. Dans second temps, nous avons opté pour une méthode d'évaluation indépendante du support, la polarisation de fluorescence.

1. 4. 1 Evaluation de l'affinité par polarisation de fluorescence

La polarisation de fluorescence (PF) est une technique appliquée à l'étude des interactions moléculaires. Elle permet d'effectuer des mesures instantanées du rapport lié/libre d'un ligand marqué par une molécule fluorescente.

A) Principe de la polarisation de fluorescence

Les mesures d'anisotropie^{91, 92} sont basées sur le principe de la photo-sélection d'excitation des fluorophores par une lumière polarisée. Les fluorophores absorbent uniquement des photons qui ont un vecteur électrique aligné en parallèle par rapport à leur moment de transition (Figure 29, A). Tout changement de l'orientation du fluorophore pendant la durée de vie de l'état excité, va induire une dépolarisation partielle ou totale de la fluorescence. La principale cause de la dépolarisation est la rotation par diffusion des fluorophores. Par conséquent, lorsque ce dernier est conjugué à un ligand de faible masse molaire, il effectue des rotations rapides ; s'il est excité par une lumière linéairement polarisée, la lumière émise sera fortement dépolarisée (Figure 29). L'interaction avec une molécule de plus grande taille va ralentir les mouvements de rotation, par conséquent, elle va diminuer considérablement la dépolarisation et la lumière émise sera plus polarisée. Les mesures d'anisotropie sont définies par le taux de polarisation $P = (I_{II} - I_T) / (I_{II} + I_T)$ et l'anisotropie $r = (I_{II} - I_T) / (I_{II} + 2I_T)$. I_{II} représente l'intensité de fluorescence d'émission parallèle au vecteur électrique d'excitation, plus la molécule est polarisée plus cette valeur augmente. I_T représente l'intensité de fluorescence perpendiculaire au vecteur électrique d'excitation.

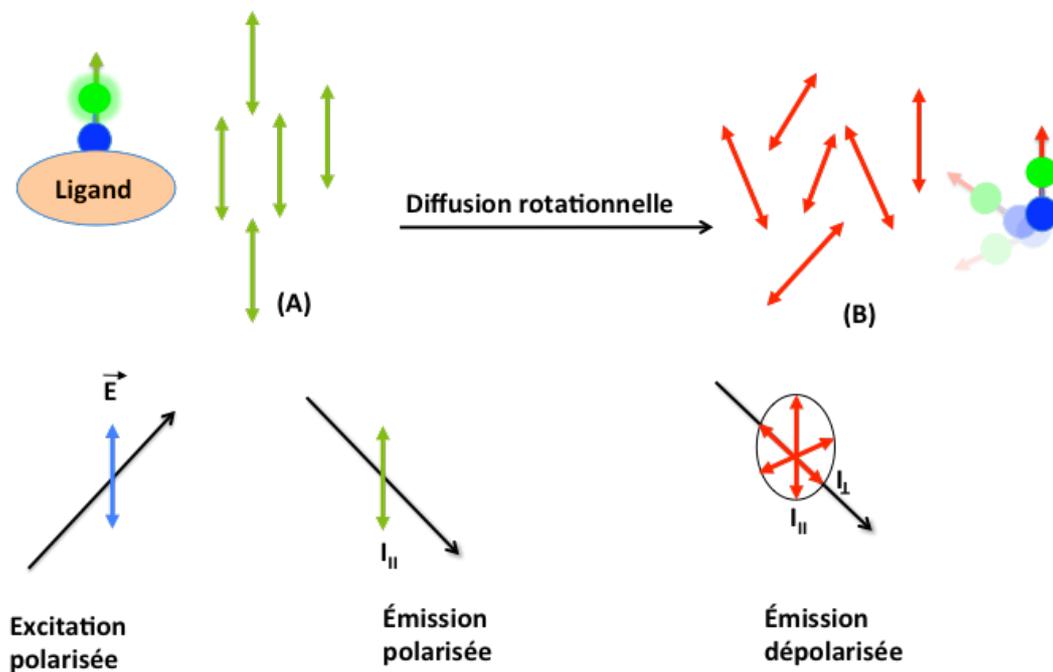


Figure 29 : Principe de la polarisation de fluorescence. Dans le cas d'une émission polarisée, l'intensité de fluorescence parallèle est supérieure à l'intensité de fluorescence perpendiculaire. Lorsque la fluorescence est dépolarisée, l'intensité de fluorescence parallèle diminue, et l'intensité de fluorescence perpendiculaire augmente, provoquant la diminution du taux de polarisation (P) et de l'anisotropie (r).

Nous avons utilisé cette méthode pour étudier l'interaction entre l'aptamère sélectionné et l'adénine conjuguée à la fluorescéine.

B) Synthèse du conjugué adénine-fluorescéine

Pour appliquer la méthode de polarisation de fluorescence à la formation du complexe aptamère/adénine, il est nécessaire de conjuguer la cible avec un fluorophore. A cet effet, un conjugué adénine-fluorescéine est synthétisé, la figure 30 montre la stratégie de synthèse.

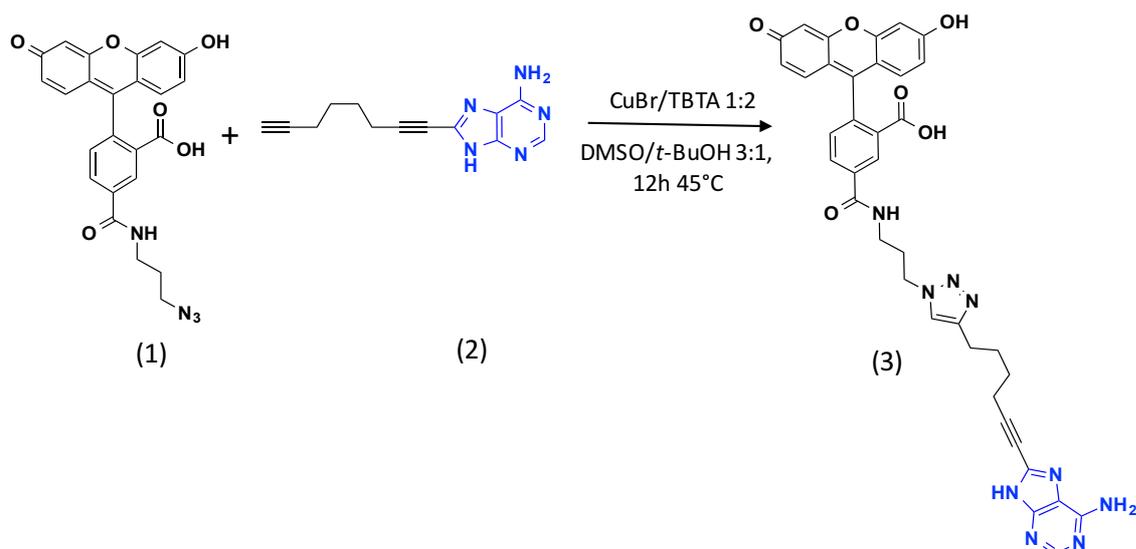


Figure 30: Synthèse d'un conjugué de l'adénine-fluorescéine (composé 3) par réaction de cycloaddition azide/alcyne de Huisgen⁸⁶. La fluorescéine azide (composé 1) et le 8 - (octa-1, 8-diynyl) -adénine (composé 2) (1 :10) sont incubés pendant 12h à 45°C dans du DMSO/t-BuOH 3 :1 en présence du CuBr/TBTA 1 :2.

La synthèse de ce composé est décrite dans le manuscrit publié (voir la page 2 de l'article).

L'analyse par spectrométrie de masse a révélé la présence de deux conjugués, le produit majoritaire correspond à l'adénine-fluorescéine, et correspond à la masse attendue (696.2 g/mol) ; la figure 31 montre le spectre obtenu.

140221-Exac-1410-LA-TC-TC01 #103-129 RT: 2.39-2.98 AV: 27 NL: 3.38E4
T: FTMS - p ESI Full ms [100.00-2000.00]

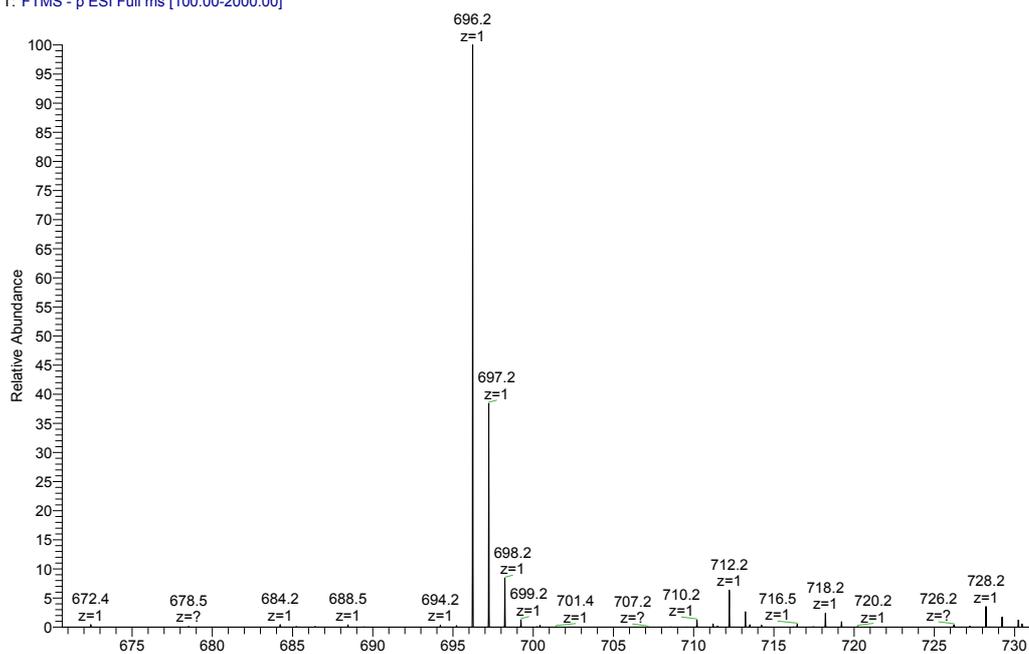


Figure 31 : Spectre de masse obtenu pour le conjugué adénine-fluorescéine synthétisé

Les résultats obtenus avec la stratégie de sélection décrite ci-dessus sont présentés au niveau de l'article joint ci-après.



Contents lists available at ScienceDirect

Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymeth

DNA aptamer selection in methanolic media: Adenine–aptamer as proof-of-concept

Thinhinane Chaou, Brune Vialet, Laurent Azéma*

Univ. Bordeaux, ARNA Laboratory, F-33000 Bordeaux, France
INSERM, U869, ARNA Laboratory, F-33000 Bordeaux, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2015
Received in revised form 3 January 2016
Accepted 4 January 2016
Available online xxx

Keywords:

Aptamer
Organic buffer
Modified nucleotide
Adenine

ABSTRACT

The major objective of this study is to investigate the usefulness of aptamers as *in situ* detection tool in organic solvents, which are often used for environmental extraction. But two problems related to the use of methanol-containing buffers have to be addressed. Firstly, the folding of nucleic acids can be impaired, because of weaker hydrogen bonding interactions. Secondly, the affinity of aptamers selected in aqueous buffers can be altered by the presence of methanol. Thus, in order to improve hydrophobicity of the DNA pool, nucleotide with hydrophobic modification 5-(octa1,7-diynyl)-2'-deoxyuridine (ODT) has been chosen instead of thymidine.

As a proof of concept, an adenine aptamer operating in presence 25% of methanol has been selected. We have shown that the modified nucleotide is essential for target binding in organic media, in addition to essential structural pattern as proposed through analysing truncated sequences analysis. The strategy described in this paper offers preliminary insight on the adaptability of the implementation of aptamers as key instrument for *in situ* detection. It could be broadened to identify other aptamers directed against other chemical species after alcoholic extraction or for monitoring by-product traces in drugs production.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Development of *in situ* detection tools is required for specific real time monitoring of various chemical and biochemical species. The detection sensitivity is related to the affinity of the molecular recognition element (MRE) for the intended target and the specificity depending on its ability to discriminate between close molecular species. Moreover, the analytical tool must be adapted for operating under conditions imposed by the context of the application. Among others, high temperature, pH variation and presence of organic solvents may be mentioned. From this viewpoint, antibodies, that are traditional detection tools, are of limited interest for use under conditions far from that of biological media.

Over the last twenty years, reports accumulated demonstrating that aptamers offer a promising alternative [1,2]. These short single-stranded oligonucleotides (DNA or RNA) are identified through a combinatorial method named SELEX. They bind specifically to their targets by complementary shape interactions. Indeed, aptamers function by folding into unique three-dimensional

conformation that dictates high-affinity and specificity binding to a variety of targets (proteins [3], peptides [4], nucleic acids [5], small molecules [6]). Aptamer-based tools were designed for analytical chemistry, diagnostic or therapeutic applications over the last decades [7,8]. They are a promising alternative to monoclonal antibodies in many applications, including pollutants detection [9], molecular imaging [10,11] or guided cancer therapy [12].

Consequently, aptamers can constitute powerful detection tools if factors resulting in alteration of aptamer specific folding are overcome. It is known that aptamers have great potential of self-renaturation after heat stress or changes in pH compared to antibodies. Nevertheless, it remains difficult to use aptamer in organic media even though a couple of examples are available [13,14]. It is noteworthy that this peculiarity is of high interest, for the detection of chemical species after extraction, or for the monitoring of by-product traces in drugs production.

But it has been shown that adaptation to organic conditions of an aptamer selected in aqueous media is an issue [14]. Change in dielectric constant can modify three-dimensional structure of the aptamer and recognition pattern, through weaker hydrogen bonding and increased van der Waals interactions [15]. Therefore, aptamer selection directly in organic media is of high-interest. We decided to undertake the identification of aptamers able to bind

* Corresponding author at: Univ. Bordeaux, ARNA Laboratory, F-33000 Bordeaux, France.

E-mail address: laurent.azema@u-bordeaux.fr (L. Azéma).

their target in the presence of high methanol concentration. To this end, the use of unnatural nucleobases is an attractive option to select aptamer with new properties, especially if the corresponding nucleotide is incorporable by DNA polymerases. Modifications introduction on the 5-position of thymidine fulfils these conditions and led to aptamers with improved binding efficiency, through a decrease in off-rate with respect to unmodified corresponding nucleic acid. According to this approach, modified aptamers have been successfully raised against small molecule [16,17] or proteins [18,19]. In order to increase hydrophobicity of the oligonucleotide library, we have chosen to introduce 5-(octa1,7-diynyl)-2'-deoxyuridine (ODT) instead of thymidine. Both triphosphate (ODTTP) and phosphoramidite derivatives of this modification are available, thus allowing enzymatic and chemical synthesis [20]. We firstly demonstrated that this modification on the thymine carbon 5 was tolerated by DNA polymerase in methanol-containing buffer, as it stands in the major groove of the double helix and does not interfere with the Watson-Crick base pairing [21]. We subsequently prepared a ODT-containing DNA library for selecting aptamers to adenine in solvent containing 25% methanol. We report the successful selection procedure, as well as the characterisation of aptamers under these conditions.

2. Experimental section

2.1. Chemistry

Reagents and solvents were purchased from Aldrich or Alfa Aesar and used without further purification. All reactions involving air- or moisture-sensitive reagents or intermediates were performed under an argon atmosphere. 5-(octa1,7-diynyl)-2'-deoxyuridine triphosphate, and 6-carboxyfluorescein azide were purchased from Baseclick.

2.1.1. 8-(1,7-Octadiynyl)-adenine (compound **1**; Fig. 1)

The protocol was adapted from literature [22]. To a degassed solution under argon of 8-bromo-adenine (1 g, 4.65 mmol) in 25 mL of anhydrous dimethylformamide was added copper iodide (0.1 g, 0.95 mmol). The solution was degassed once more. Pd(PPh₃)₄ (0.54 g, 0.465 mmol), 1,7-octadiyne (2.48 g, 23.5 mmol) and Et₃N (1.3 mL, 9.4 mmol) were sequentially added. The slurry was stirred at 60 °C overnight, and volatiles were evaporated. The crude product was purified by chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/AcOEt 1/1 and MeOH gradient 0–20%) to give **1** in 55% yield.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 13.3 (b, 1H, NH), 8.1 (s, 1H, Ar H), 7.3 (b, 2H, NH₂), 2.5 (2s, 3H, CH and CH₂), 2.2 (s, 2H, CH₂), 1.6 (s, 4H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 17.7, 18.4, 27.1, 27.5, 71.9, 72.7, 84.6, 93.3, 119.4, 132.6, 150.3, 153.7, 155.9.

MS (ESI) *m/z* 240 (M+H⁺), 262 (M+Na⁺).

2.1.2. Fluorescein-adenine conjugate

Compound **1** (17 mg, 72 μmol) was dissolved in ^tBuOH/DMSO 1/3 (2 mL). CuBr (10 mg, 70 μmol), tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (TBTA, 74 mg, 140 μmol) and sodium ascorbate (60 mg, 0.3 μmol) were sequentially added, followed by addition of fluorescein-N₃ (144 μmol) [23]. The slurry was stirred overnight at 45 °C and purified through HPLC to obtain the conjugate as an orange solid. Compounds were characterized through Mass Spectrometry. Compound **3**: *m/z* 696.2 (M–H⁺).

2.1.3. Oligonucleotide syntheses

Oligonucleotides were synthesized on an ABI Expedite 8909 synthesizer using conventional β-cyanoethyl phosphoramidite

chemistry with the standard DNA protocol for 1 μmol-scale synthesis and purification. 5-(octa1,7-diynyl)-2'-deoxyuridine cyanoethyl phosphoramidite was purchased from Baseclick. Reagents were purchased from Link and Glen Research.

2.1.4. Analysis

Flash column chromatography was carried out on silica gel (Merck, SDS 60 Å, 40–63 μm, VWR). Analytical thin-layer chromatography (TLC) was conducted on Macherey–Nagel precoated silica gel 60F254 plates, and compounds were visualized by irradiation (254 nm) or by staining with iodine, ninhydrin or anisaldehyde stain. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker AC 300 MHz spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm, δ) referenced to the residual ¹H resonance of the solvent. Mass spectra were recorded on Thermo LCQ advantage. HPLC was performed using a Hitachi L2455 chain equipped with a Macherey–Nagel RP-18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm for analytical HPLC and 250 mm × 10 mm, 5 μm for semipreparative HPLC). All HPLC analyses were run at RT. A gradient of CH₃CN containing 0.1% TFA (eluent B) in water containing 0.1% TFA (eluent A) from 5% to 100% was used at a flow rate of 1 mL/min for analytical HPLC and 5 mL/min for semipreparative HPLC.

2.2. Beads preparation

2.2.1. Adenine-beads (A-beads) [24]

Magnetic carboxylic functionalised beads (Dynabeads MyOne) were purchased from Invitrogen. 10 mg of beads (1 mL) were washed three times with MES buffer (2-[N-morpholino] ethane sulfonic acid, 15 mM, pH 6). Beads were collected and incubated 3 h at 25 °C with N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC, 1.5 M in MES, 50 μL) and O-(2-aminoethyl)-O'-(2-azidoethyl) diethylene glycol [25] (1.2 M in MES, 50 μL). Beads were collected, washed three times with TT buffer (tris(hydroxymethyl)aminomethane 0.25 M, pH 8, 0.01% Tween-20). These azido-beads were subsequently engaged in CuAAC reaction. 5 mg of azido-beads were washed two times with 500 μL of ^tBuOH/H₂O 1/1 and suspended in 100 μL of ^tBuOH/H₂O 1/1. Compound **1** (1 mM in ^tBuOH, 50 μL), CuSO₄ (0.12 M in H₂O, 50 μL) and sodium ascorbate (0.6 M in H₂O, 50 μL) were sequentially added and the suspension was stirred overnight at 45 °C. Completion of the reaction was monitored by HPLC (Fig. S1). Beads were collected and washed three times 30 mn with TE buffer (tris(hydroxymethyl)aminomethane 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM), and three times with TT buffer. Beads were stored in TE buffer at 4 °C.

2.2.2. Counter selection (N-beads)

As for adenine beads, 5 mg of azido-beads were washed two times with 500 μL of ^tBuOH/H₂O 1/1 and suspended in 100 μL of ^tBuOH/H₂O 1/1. (1-Trimethylsilyl)-1, 7 octadiyne [25,26] (1 mM in ^tBuOH, 50 μL), CuSO₄ (0.12 M in H₂O, 50 μL) and sodium ascorbate (0.6 M in H₂O, 50 μL) were sequentially added and the suspension was stirred overnight at 45 °C. Beads were collected and washed three times 30 mn with TE buffer and three times with TT buffer and subsequently suspended in Et₃N, 3HF (0.5 mM in THF, 100 μL). After 2 h shaking at room temperature, beads were collected, washed three times with TE buffer and stored in TE buffer at 4 °C.

2.3. Production of alkyne-containing library

2.3.1. DNA pool

ssDNA pool containing 30 random nucleotides central core, flanked by two constant regions, required for enzymatic amplification (₅ACTGACTGACTGACTGACTA-6C₃-GGGAGACAAGAA

TAAACGCTCAA-N₃₀-TTCGACAGGAGGCTCACAACAGGC₃) was synthesised by phosphoramidite chemistry process and purified by gel electrophoresis. 5' constant region includes 6 propylene linkers (C₃) that constitute polymerase reaction breakpoint, leading to generation of shorter complementary strands easily separated by electrophoresis on denaturing gel. This short strand constitutes the library for the selection.

2.3.2. Library production

3 nmoles of library was used in 3 ml PCR reaction. The PCR reaction mixture contains 2 μM of heavy P3 primer, 2 μM of P5 primer, 0.2 mM of each nucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP and ODTP), 0.1 U/μl of TaqDNA polymerase (New England Biolabs) in PCR buffer (67 mM Tris–HCl pH 8.8, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM β-mercaptoethanol, 1.17 mM MgCl₂). Thermal cycle comprises the following steps: one cycle of 10 min at 95 °C, followed by 19 thermal cycles of 1 min 95 °C, 1 min 60 °C, 1.5 min 72 °C and one cycle 10 min 72 °C. Recovered PCR products were desalted, filtered and concentrated on 10 K Nanosep devices (Pall), then purified by 8% PAGE. The shorter complementary strand incorporating dODTP was electro-eluted in buffer containing 40 mM Tris, 20 mM glacial acetic acid, 1 mM EDTA pH 8.0 and 0.1% SDS. Recovered ssDNA library was desalted on G25 Sephadex column (GE healthcare), dried and suspended in water.

2.4. Aptamer selection protocol

2.4.1. Selection

Oligonucleotide candidates containing ODT (from 500 pmol in round 1 to 15.6 pmol in round 11) were diluted in 10 μl water and heated 5 min at 75 °C, cooled 5 min at 4 °C, and incubated 5 min at room temperature in a total volume of 100 μl of selection buffer adjusted to final concentrations of 1× PBS, 1 mM MgCl₂, 100 mM KCl (SLE buffer) and 25% methanol. Negative selection beads (N-beads) were washed three times with SLE, equilibrated for 5 min in SLE at RT, and finally suspended in 100 μl of prepared oligonucleotides for 30 min at RT. Supernatant was collected and introduced in a second counter-selection round. The supernatant was then incubated with adenine beads (A-beads) for 30 min at room temperature with a total concentration of immobilized adenine of 200 μM (round 1) down to 100 μM (round 10). Supernatant was discarded and A-beads were washed with SLE buffer/25% MeOH (from 1 × 100 μL in round 1 to 10 × 100 μL in round 11). Bound oligonucleotides were subsequently eluted from A-beads with 1 mM free adenine in 100 μL SLE buffer/25%MeOH. Recovered candidates were PCR amplified in a total volume of 1 mL, following the library production protocol (final percentage of MeOH was therefore 2.5% in PCR mixture).

2.4.2. Cloning-sequencing

Upon completion of 11 rounds of selection/amplification, DNA candidates were cloned according to TOPO TA Cloning kit protocol (Invitrogen). Positive colonies from transformed *Escherichia coli* bacteria were PCR amplified, and resulting products were sequenced (Eurofins, MWG-Operon).

2.5. Fluorescence beads assay

2.5.1. Adenine beads binding assays

Oligonucleotides were chemically synthesised with a 5' termini fluorescein. Candidates (150 nM, SLE buffer, 100 μL) were structured in the absence or presence of 25% of methanol and incubated for 30 min at RT with A-bead or N-beads (100 μM). Magnetic collection beads in interaction with ssDNA allowed measurement of supernatant fluorescence of non-bound candidates and determination of binding percentage, which was normalised to control beads.

Thus, binding percentage was $B\% = (1 - (Fa/Fc)) * 100$, where Fa is the fluorescence of unbound ssDNA to A-bead and Fc is fluorescence of unbound ssDNA on the surface of N-beads. Fluorescence measurements were performed on Berthold Twinkle LB 970 microplate fluorimeter.

2.5.2. Determination of dissociation constant of A'12

The aptamer was incubated at 150 nM for 30 min with A-beads in the presence of increasing total adenine concentration (0–100 μM), in SLE buffer. Experiment was performed in 100 μl total volume. Binding percentages are determined according to adenine concentration variations. Curves were fitted using Hill equation, as $(1 - (Fa/Fc)) * 100 = \%B = \frac{1}{1 + (\frac{K_D}{L})^n}$ where Fa is the fluorescence of unbound aptamer at given adenine concentration, Fc the fluorescence in absence of adenine, L the unbound adenine, K_D the dissociation constant and n the Hill factor of cooperativity.

2.6. Fluorescence anisotropy assay

2.6.1. Fluorescence polarization binding assay

Fluorescein-adenine (10 nM in SLE buffer, 25% MeOH) was incubated with increasing concentration of aptamer (0–100 μM) in the same buffer. Measurements were performed on a TECAN INFINITE M1000PRO device set with following parameters: 470 nm excitation wavelength, 525 nm emission wavelength, 5 nm excitation and emission bandwidth, settled time of 25 ms, flashes number of 10 and G-factor of 1.076 (as calibrated from free fluorescein: 20 mP for 1 nM fluorescein solution in 0.01 M NaOH). Curves were fitted using Hill equation, as $\Delta r = \frac{1}{1 + (\frac{K_D}{L})^n}$ where Δr represents the variation of anisotropy of adenine-fluorescein conjugates at a given aptamer concentration, L the aptamer concentration, K_D the dissociation constant and n the Hill factor of cooperativity.

2.7. Graphical TOC

The predicted secondary structure of A'12c was subsequently modelled in 3D with RNAcomposer software and rendered with Chimera software.

3. Results and discussion

3.1. Selection design

In the framework of an exobiology project, we were seeking for functional oligonucleotide aptamers towards adenine in methanol-containing solvent. In one hand, adenine is claimed to be a good marker of life trace [27]. On the other hand, extraction conditions of extra-terrestrial rocks involve methanol as a primary solvent. To this aim, we synthesised a DNA library with a 30 positions random window in which we substituted standard TTP by 5-(octa-1,7-diynyl)-2'-deoxyuridine triphosphate (ODTTP) (**2**, Fig. 1) in order to improve the solubility of oligomers in organic solvents. Whereas benzyl or naphthyl modified thymidine have been successfully introduced in the design of SOMAmers [28], we went for an alkyne-bearing nucleobase. Besides the assumed hydrophobicity increase, we were interested in a modification that could allow further labelling of the aptamer, through CuAAC ligation [29]. For the production of the DNA pool we first checked that Taq DNA polymerase (New England BioLabs) incorporates ODTP properly (Fig. S2A and B). Non-denaturing gel electrophoresis showed that the DNA pool amplified in aqueous solution with the same enzyme (in the presence of ODTP), yields one band that moves slower than the one amplified with standard dTTP suggesting that ODTP is well incorporated in DNA random library (Fig. S2C). Template

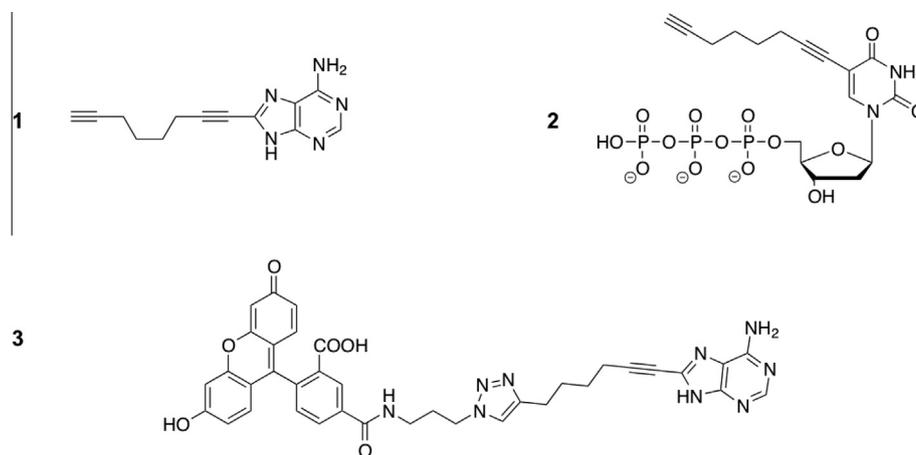


Fig. 1. Chemicals used in this study. 1/8-(1,7-octadiynyl)-adenine. 2/5-(octa1,7-diyne)-2'-deoxyuridine triphosphate (ODTTP). 3/8-(5-carboxyfluorescein-aminopropylamido-1,2,3-triazolo)-adenine.

amplification was then evaluated in the presence of ODTTP by simulating post selection amplification conditions in the presence of methanol. Results showed that methanol is not a limiting factor for selection in the presence of up to 50%: remaining methanol (following ten fold dilution of the selection sample) had no influence on DNA polymerase activity. Incorporation of ODTTP under these conditions was not affected (Fig. S3). In general family A DNA polymerase such as Taq DNA polymerase are described as not good at successive incorporation of modified nucleotides [30]. However, other groups demonstrated that Taq DNA polymerase incorporates properly thymidine bearing C5 rigid modification [31]. Our results based on PCR amplification are in agreement with analysis at molecular level. Moreover, we observed high incorporation efficiency with the Taq DNA polymerase whereas the use of Vent DNA polymerase (family B) led to low amplification yield. We assume that the type of modification and experiment conditions are important factors for efficiency of amplification.

Targeting a small compound such as adenine requires its immobilization on a solid support, in order to selectively capture oligonucleotides displaying affinity for the target molecule. We performed its covalent immobilisation on functionalised carboxylic acid magnetic beads using *O*-(2-aminoethyl)-*O'*-(2-azidoethyl) diethylene glycol linker [25,32]. The azido function was subsequently engaged in a CuAAC reaction [33] with 8-(octa-1,7-diyne)-adenine (**1**, Fig. 1) to generate the target-bound beads. Linkage on the C8 position of adenine was preferred, as it preserves π -stacking and hydrogen bonding capacity for interaction with aptamers. In the same manner, azido function was engaged in CuAAC reaction with octa-1, 7-diyne thus providing a control for counter-selection steps: oligonucleotides interacting with such functionalised beads were discarded.

Control beads were also used for evaluating the rate of non-specific interaction at increasing methanol concentration. Above 25% non-specific binding increased dramatically, compared to aqueous conditions. Therefore, selection buffer (SLE) containing 25% methanol was chosen to carry out 11 selection/amplification rounds (see Section 2).

3.2. Identification of adenine-binding aptamers

Analysis of 49 sequences obtained following cloning of rounds 10 and 11, revealed limited homology. Nevertheless, almost all candidates exhibited several purine-rich tracks, the mean rate of GA bases in the random window being about 61%. 58% of

sequences displayed at least 2 blocks of purines, one of them being at least 6 consecutive purines long. Secondary structure prediction showed that purine-rich stretches are located in internal loops in 41% of sequences (family 1), in apical loops in 21% of sequences (family 2). In remaining sequences purine rich stretches are mostly involved in stem pairing. 21% of sequences constitute family 3 that is characterized by the presence of short pyrimidine loops including ODT; and 17% of sequences constitute family 4 that has no similarity to those described previously.

We evaluated the binding properties of representative candidates with the adenine-functionalized beads used for the SELEX process. Four candidates belong to family 1 (A'12, A16, B8, A'3), three candidates belong to family 2 (A36, C3, B'14), two candidates have pyrimidine loops including ODT (A44 and B19) and finally one candidate has no particular features shared with the other sequences (A'47). Selected candidates were chemically synthesised with a 5' fluorescein residue. After incubation with beads, the percentage of bound candidates was determined by fluorescence intensity measurement (Fig. 2) [34].

Candidates within purine-rich loops (family 1 and 2) show the most efficient binding for adenine. The oligonucleotide A'12 that displays the strongest binding was chosen for further studies. The A'12 sequence displays five purine rich regions PuR1 **GAAACC**, PuR2 **AGAGAG**, PuR3 **AGAGGA**, PuR4 **GGGG** and Pur5 **GAGCC** (Fig. 3). They are all located in the random window, except PuR1 that is part of the 5' fixed region. We used mfold [35] to predict A'12 secondary structure, substituting for folding regular thymine nucleotides to ODT in the aptamer sequence.

Two different secondary structures, A'12-1 and A'12-2 (Fig. 3) of similar energy ($\Delta G \leq -21 \text{ kJ mol}^{-1}$) were predicted. In A'12-2, PuR1 and PuR3 form a short apical purine loop (L4) and an internal purine loop (L5), respectively, whereas PuR3 and PuR4 are involved in double-stranded stems. In A'12-1 PuR1 and PuR2 are part of double-stranded regions whereas PuR3 and PuR4 form an internal purine loop (L2), similar to that identified previously in two aptamers directed towards adenosine monophosphate (AMP) selected independently from RNA or DNA libraries in aqueous buffers [36,37]. These two aptamers differ in secondary structures and binding stoichiometry but they display the same purine richness in the ligand recognition pocket. AMP in both DNA and RNA aptamers is stabilized by stacking between purine bases and forms identical G.AMP specific hydrogen bounds [38]. Moreover, similar purine rich motifs identified in the human genome have been demonstrated to be involved in ATP binding with a dissociation constant 10 fold lower than its physiological concentration [39].

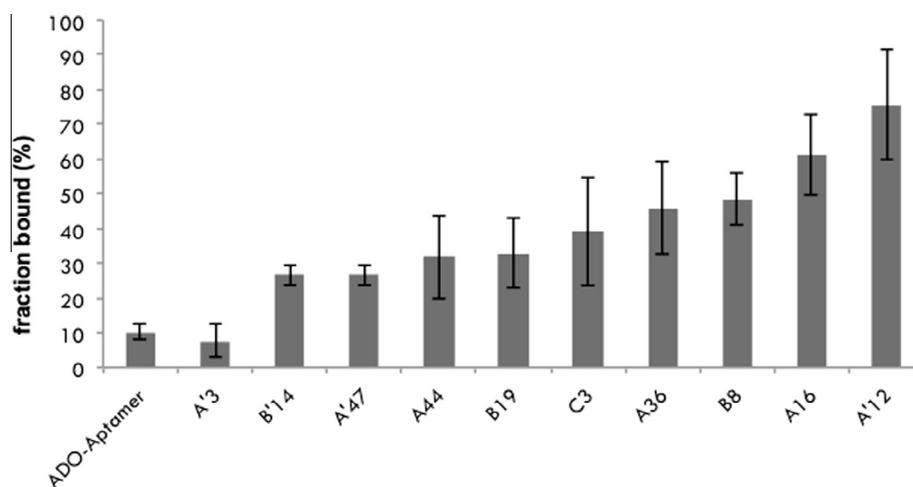


Fig. 2. Binding of different candidates to adenine-conjugated beads. 100 μ M adenine, and 150 nM candidate in SLE buffer (containing 25% methanol) were used. DNA adenosine aptamer was used as control.

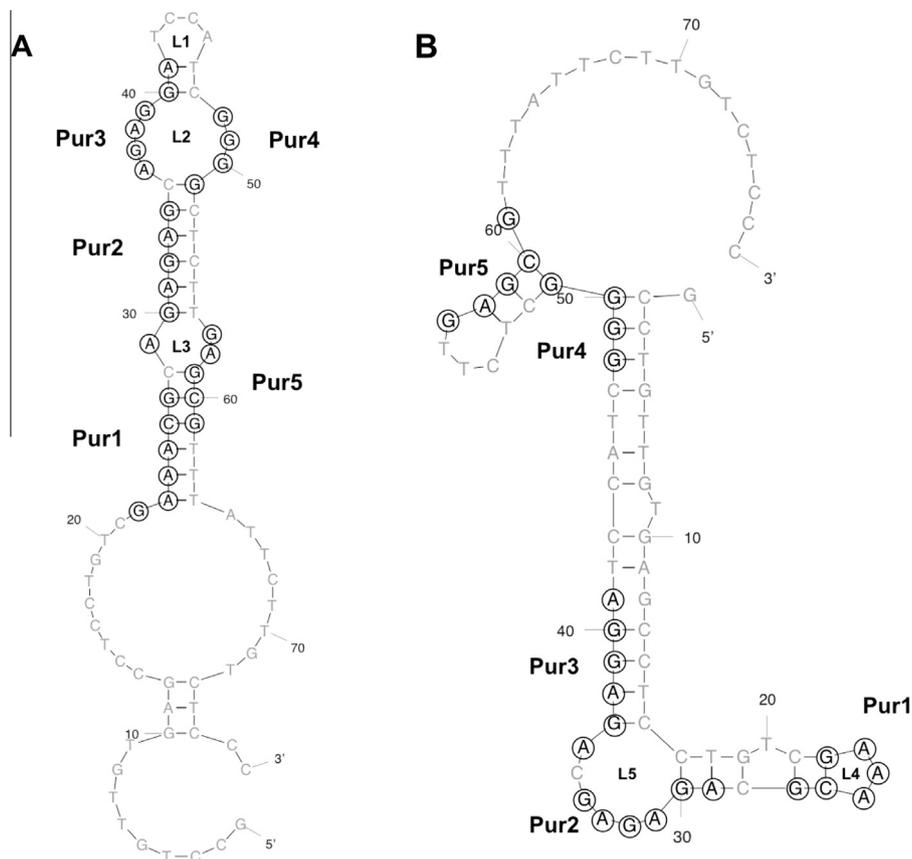


Fig. 3. Secondary structures for the A'12 aptamer, A'12-1 (panel A) and A'12-2 (panel B) as predicted by mfold. Purine-rich regions are highlighted.

Therefore, purine rich motifs can be considered as a hallmark of specific interaction between nucleic acid recognition elements and adenosine derivatives.

3.3. Contribution of ODT to interaction in presence of methanol

We have evaluated the contribution of ODT to the A'12 aptamer adenine binding. For this purpose, two 5' fluoresceine-conjugated variants were evaluated; the first one (A'12+) comprises the ODT,

and the second (A'12-) comprises thymidines that substitute ODT. In addition, DNA adenosine aptamer (ADO-aptamer) previously described, was evaluated [37]. Tests were carried out in the presence and in the absence of 25% methanol through adenine-bead capture strategy (Fig. 4A).

A'12+ binds adenine both in the presence and in the absence of methanol, with a slightly higher efficiency in methanol (Fig. 4A). We determined the dissociation constant of adenine-A'12 complex in methanol. Triplicate adenine-beads binding assays allowed us to

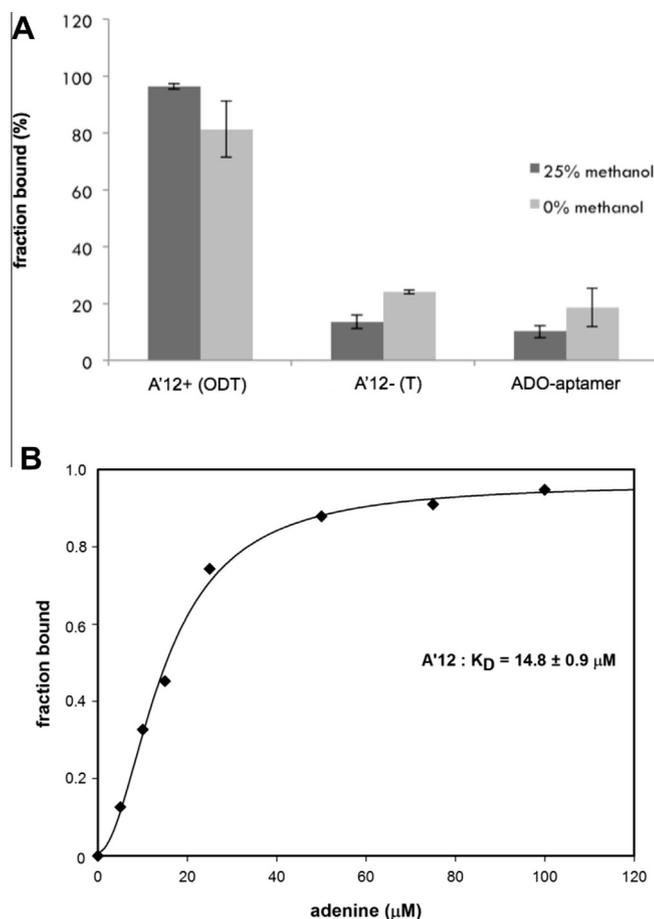


Fig. 4. Binding assay of aptamer analogues. (A) Contribution of octadecyl modification to aptamer affinity for adenine, evaluated through adenine-beads binding assay, in presence of 25% methanol (solid bars) or in aqueous buffer (grey bars). Binding percentage of fluorescent A'12 incorporating ODTP (A'12+), of the TTP-containing aptamer (A'12-) and the adenosine aptamer (ADO-aptamer). (B) Titration curve of A'12 (150 nM), derived from adenine-beads binding assay.

evaluate an apparent K_D of $14.8 \pm 0.9 \mu\text{M}$ (Fig. 4B). In contrast, a weaker binding is observed with A'12- as well as with the adenosine DNA aptamer (selected in aqueous buffer) [37].

These results suggest that our approach enabled the selection of a high affinity aptamer efficient in organic solvents thanks to the incorporation of ODTP. We assume that the modified residues might be involved in aptamer folding and target recognition.

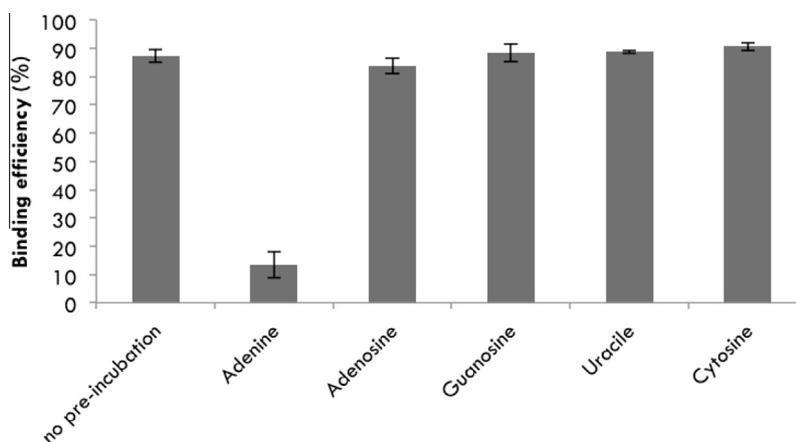


Fig. 5. Specificity of A'12 aptamer for adenine, compared to other nucleobases or nucleosides. A'12 is pre-incubated with 1 mM competitor before evaluation of adenine binding by bead capture (100 μM total adenine concentration).

3.4. Specificity assay

Aptamers directed towards nucleobases share similar interaction patterns, involving π -stacking and specific hydrogen bonding, that are required for discriminating between the different nucleic acid bases [38]. The specificity of A'12 aptamer for adenine was evaluated by competition with other nucleobases or ribonucleosides: the binding of A'12 was determined by the adenine-bead assay after incubation with a large excess (1 mM) of different nucleic acid base derivatives. Fig. 5 shows that A'12 is highly specific for adenine as adenosine, guanosine, cytosine and uracile did not displace it from the beads. It is noteworthy that we went for guanosine not guanine, because of the poor solubility of guanine in aqueous buffers and its insolubility in methanol.

The lack of interaction with adenosine in our conditions could suggest a tight recognition of adenine, especially through hydrogen bonding to N9 nitrogen, which is involved in the glycosidic bond in the case of adenosine. Regarding AMP aptamer, deletion of both the 2'- and the 5'-hydroxyles of adenosine resulted in an affinity decrease [37], whereas the phosphate has less significant interaction [40]. As discussed in previous section, this result could suggest that rational design of an adenine-binding aptamer from an existing aptamer, that binds adenosine in water, would not have been successful.

3.5. Evaluation of truncated structures

Design of functional shortened aptamers is usually based on the mfold predicted structure. Functional shorter sequences have to be designed with regards to essential recognition motifs. If we hypothesize that purine rich regions (PuR) are crucial for the interaction with adenine, they must be part of A'12 derived minimal sequences. We first synthesized two short ODT-containing sequences: A'12-a and A'12-b (Fig. 6). A'12-a includes PuR3 and PuR4 organised in loop L2 as in A'12-1 structure. A'12-b is designed to test the involvement of PuR1 and PuR2 in adenine recognition and derives from A'12-2, with loop L4 and L5. Evaluation of A'12-a revealed efficient adenine binding only in aqueous buffer (Fig. 7). On the other hand, evaluation of A'12-b revealed lower adenine affinity compared to A'12 and to A'12-a in aqueous buffer. However addition 25% of methanol increases significantly affinity for adenine compared to A'12-a.

Thus, this suggests that both L2 loop including PuR3 and PuR4 from A'12-a structure and L4 and L5 including respectively PuR1 and PuR2 from A'12b are required for efficient interaction with adenine in presence of methanol. We therefore removed the 5'

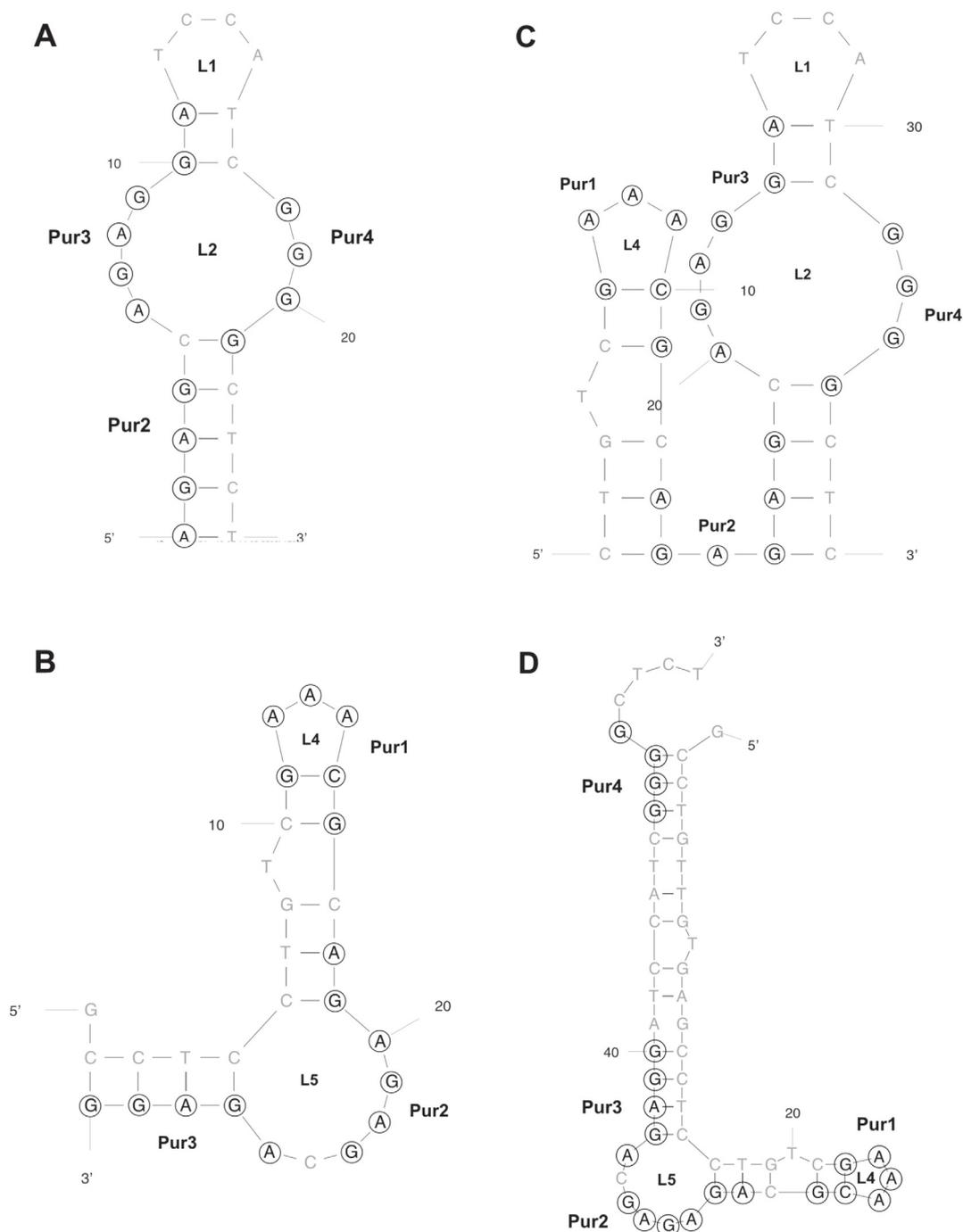


Fig. 6. Truncated derivatives of the aptamer A⁰¹². (A) A^{012a}; (B) A^{012b}; (C) A^{012c}; (D) A^{012d}. Purine-rich are highlighted. Secondary structures as predicted by mfold program.

and 3⁰PuR complementary sequences of A⁰¹² which leads to A^{012-c} (Fig. 6C). It is predicted to be organized into two stem loop motifs, including L1 and L2 as in A^{012-a} and L4 as in A^{012b} whereas PuR2 track is involved in stems formation. We also designed A^{012-d} (Fig. 6D) by lengthening the 5⁰ part of A^{012-c}; this will prevent organisation in two loop motifs like A^{012-c}.

A^{012-c} binds efficiently adenine in presence of 25% of methanol: at a concentration of 100 μM adenine, 85% of binding is observed. A^{012-d} binds efficiently adenine in aqueous buffer, whereas a strong decrease is observed in the presence of methanol. The folding in double loop motif, which could be considered as a merge of

structural organisations off full-length A⁰¹² aptamer, seems to be required for adenine recognition in methanol.

Finally, we measured the equilibrium dissociation constant of the adenine-A^{012c} complex using fluorescence polarization compared to fluorescence beads assay. For this purpose, we synthesized an adenine-fluorescein conjugate (3, Fig. 1). The binding of the labelled adenine to the aptamer will result in a decreased mobility of the reporter, i.e. in an increased anisotropy. The titration curve obtained indicated that the fluorescein modification on the adenine C8 position did not prevent binding and consequently that this position is not involved in the interaction with

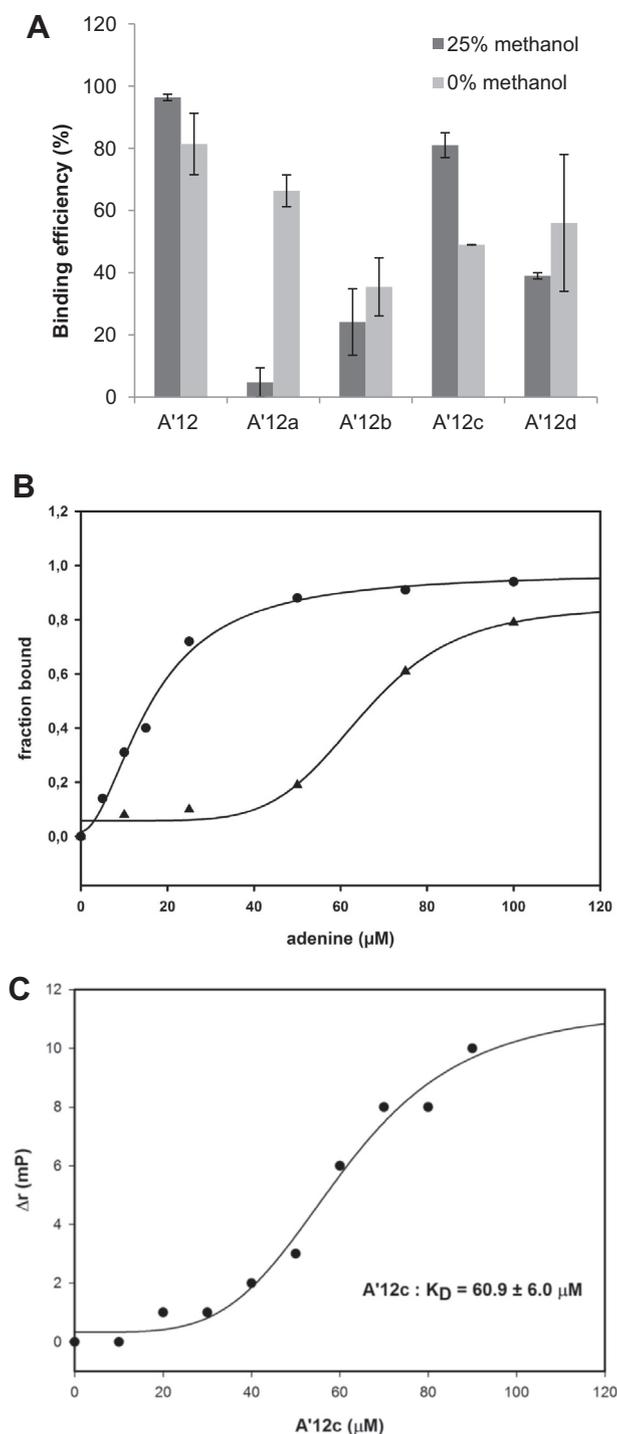


Fig. 7. (A) Evaluation of the binding efficiency of truncated versions of the aptamer A'12, using adenine-beads binding assay, in presence of 25% methanol (solid bars) or in aqueous buffer (grey bars). (B) Compared titration curves of A'12 (black squares) and A'12c (black triangles), derived from adenine-beads binding assay. Aptamers concentrations: 150 nM, in 25% methanol buffer. Apparent K_D of A'12: 15 μ M; A'12c: 65 μ M. (C) Binding constant evaluation of A'12-c, through fluorescence anisotropy assay. The K_D of 60 μ M is consistent with the first experiment.

the aptamer. This was anticipated as adenine was grafted onto the beads through the same position for SELEX. We deduced an apparent K_D of $60.9 \pm 6.0 \mu$ M in 25% MeOH (Fig. 7C), consistent we the value obtained using fluorescence assay with adenine-beads (65 μ M, Fig. 7B).

4. Conclusion

The development of tools for the detection of small chemicals in organic conditions is of high interest, with potential applications in various fields such as pollutant detection, drug manufacturing or product traceability. Aptamers constitute a class of sensing tools, thanks to their high affinity and specificity for a wide range of target. But their use in organic conditions is hampered by solubility and weaker hydrogen bonding capability. Adaptation to organic condition of an aptamer selected in aqueous buffer is an issue. We have therefore chosen to directly select aptamer in methanol-containing solvent, with incorporation during the SELEX process of a lipophilic modified residue, ODT. We assumed that this modification might enhance oligonucleotide solubility and could participate to the stabilization of the complex with our proof-of-concept target, adenine. We obtained an adenine-binding aptamer A'12, with an apparent K_D of ca. 15 μ M for adenine in the presence of 25% methanol. This aptamer is of interest for detecting adenine in organic solvents, in which aromatic compounds usually present higher solubility constant than in aqueous buffer. Interestingly, the aptamer A'12 is more efficient for binding adenine than a closely related previously described aptamer, even in aqueous buffer. Moreover, the incorporation of regular thymidines instead of ODT led to an A'12 variant with dramatically decreased affinity. These results demonstrate that our approach allowed the selection of aptamer that could not be derived from an existing aptamer obtained in aqueous buffer. Moreover, this work proposes an application of octadiyne derivatives, enhancing the chemical diversity of aptamers.

Following this proof-of concept, we will generalize our selection procedure and develop aptamers directed towards poorly water-soluble chemicals, as pollutants. Efforts for getting access to signalling aptamers could take advantage of the folding structure of A'12c. Indeed, this stem-loop aptamer could be engineered to lead to structure switching kissing complex [41]. The use of beads immobilised target limited the concentration of methanol to 25%. Whereas the implement of selection strategies where the target is free in solution will open the door in higher methanol concentration usefulness.

Acknowledgement

We acknowledge the support of the Conseil Régional d'Aquitaine (grant 20101303002) and the Centre National d'Études Spatiales (n°115451/00). Eric Dausse (structures analysis) and Jean-Jacques Toulmé are gratefully acknowledged for their help.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.01.002>.

References

- [1] C. Tuerk, L. Gold, *Science* 249 (4968) (1990) 505–510.
- [2] A.D. Ellington, J.W. Szostak, *Nature* 346 (6287) (1990) 818–822.
- [3] E.W. Ng, D.T. Shima, P. Calias, E.T. Cunningham, D.R. Guyer, A.P. Adamis, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 5 (2) (2006) 123–132.
- [4] P. Nadal, M. Svobodova, T. Mairal, C.K. O'Sullivan, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (29) (2013) 9343–9349.
- [5] F. Ducongé, J.J. Toulmé, *RNA* 5 (12) (1999) 1605–1614.
- [6] R.D. Jenison, S.C. Gill, A. Pardi, B. Polisky, *Science* 263 (5152) (1994) 1425–1429.
- [7] I. Palchetti, M. Mascini, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (10) (2012) 3103–3114.
- [8] E. Dausse, S. Da Rocha Gomes, J.-J. Toulmé, *Curr. Opin. Pharmacol.* 9 (5) (2009) 602–607.
- [9] J.A. DeGrasse, *PLoS One* 7 (3) (2012) e33410.

- [10] S. Da Rocha Gomes, J. Miguel, L. Azéma, S. Eimer, C. Ries, E. Dausse, H. Loiseau, M. Allard, J.-J. Toulmé, *Bioconjugate Chem.* 23 (11) (2012) 2192–2200.
- [11] S.D.R. Gomes, L. Azéma, M. Allard, J.-J. Toulmé, Aptamers as imaging agents, *Expert Opin. Med. Diagn.* 4 (2010) 511–518.
- [12] J. Li, H. Zheng, P.J. Bates, T. Malik, X.-F. Li, J.O. Trent, C.K. Ng, *Nucl. Med. Biol.* 41 (2014) 179–185.
- [13] W.-B. Shim, M.J. Kim, H. Mun, M.-G. Kim, *Biosens. Bioelectron.* 62 (2014) 288–294.
- [14] A.K. Behera, K.J. Schlund, A.J. Mason, K.O. Alila, M. Han, R.L. Grout, D.A. Baum, *Biopolymers* 99 (6) (2013) 382–391.
- [15] T.T. Herskovits, J.P. Harrington, *Biochemistry* 11 (25) (1972) 4800–4811.
- [16] Y. Imaizumi, Y. Kasahara, H. Fujita, S. Kitadume, H. Ozaki, T. Endoh, M. Kuwahara, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (25) (2013) 9412–9419.
- [17] H. Fujita, K. Nakajima, Y. Kasahara, H. Ozaki, M. Kuwahara, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 (2) (2015) 333–336.
- [18] D.R. Davies, A.D. Gelinás, C. Zhang, J.C. Rohloff, J.D. Carter, D. O'Connell, S.M. Waugh, S.K. Wolk, W.S. Mayfield, A.B. Burgin, T.E. Edwards, L.J. Stewart, L. Gold, N. Janjic, T.C. Jarvis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (49) (2012) 19971–19976.
- [19] A.D. Gelinás, D.R. Davies, T.E. Edwards, J.C. Rohloff, J.D. Carter, C. Zhang, S. Gupta, Y. Ishikawa, M. Hirota, Y. Nakaishi, T.C. Jarvis, N. Janjic, *J. Biol. Chem.* 289 (12) (2014) 8720–8734.
- [20] J. Gierlich, K. Gutmiedl, P.M.E. Gramlich, A. Schmidt, G.A. Burley, T. Carell, *Chem. Eur. J.* 13 (34) (2007) 9486–9494.
- [21] J.D. Watson, F.H. Crick, *Nature* 171 (4356) (1953) 737–738.
- [22] P. Lang, G. Magnin, G. Mathis, A. Burger, J.-F. Biellmann, *J. Org. Chem.* 65 (23) (2000) 7825–7832.
- [23] P.M. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem., Int. Ed.* 47 (18) (2008) 3442–3444.
- [24] R.M. Williams, C.L. Carihfield, S. Gattu, L.A. Holland, L.J. Sooter, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (8) (2014) 14332–14347.
- [25] F. Tran, A.V. Odell, G.E. Ward, N.J. Westwood, *Molecules* 18 (9) (2013) 11639–11657.
- [26] B.M. Trost, M.T. Rudd, *Org. Lett.* 5 (24) (2003) 4599–4602.
- [27] M.P. Callahan, K.E. Smith, H.J. Cleaves, J. Ruzicka, J.C. Stern, D.P. Glavin, C.H. House, J.P. Dworkin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (34) (2011) 13995–13998.
- [28] J.C. Rohloff, A.D. Gelinás, T.C. Jarvis, U.A. Ochsner, D.J. Schneider, L. Gold, N. Janjic, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 3 (2014) e201.
- [29] F. Tolle, G.M. Brändle, D. Matzner, G. Mayer, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 54 (37) (2015) 10971–10974.
- [30] H.A. Held, S.A. Benner, *Nucleic Acids Res.* 30 (17) (2002) 3857–3869.
- [31] S.E. Lee, A. Sidorov, T. Gourlain, N. Mignet, S.J. Thorpe, J.A. Brazier, M.J. Dickman, D.P. Hornby, J.A. Grasby, D.M. Williams, *Nucleic Acids Res.* 29 (7) (2001) 1565–1573.
- [32] K. Shimokawa, K. Yamada, O. Ohno, Y. Oba, D. Uemura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (1) (2009) 92–95.
- [33] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 40 (11) (2001) 2004–2021.
- [34] L. Gold, D. Ayers, J. Bertino, C. Bock, A. Bock, E.N. Brody, J. Carter, A.B. Dalby, B.E. Eaton, T. Fitzwater, D. Flather, A. Forbes, T. Foreman, C. Fowler, B. Gawande, M. Goss, M. Gunn, S. Gupta, D. Halladay, J. Heil, J. Heilig, B. Hicke, G. Husar, N. Janjic, T. Jarvis, S. Jennings, E. Katilius, T.R. Keeney, N. Kim, T.H. Koch, S. Kraemer, L. Kroiss, N. Le, D. Levine, W. Lindsey, B. Lollo, W. Mayfield, M. Mehan, R. Mehler, S.K. Nelson, M. Nelson, D. Nieuwlandt, M. Nikrad, U. Ochsner, R.M. Ostroff, M. Otis, T. Parker, S. Pietrasiewicz, D.I. Resnicow, J. Rohloff, G. Sanders, S. Sattin, D. Schneider, B. Singer, M. Stanton, A. Sterkel, A. Stewart, S. Stratford, J.D. Vaught, M. Vrkljan, J.J. Walker, M. Watrobka, S. Waugh, A. Weiss, S.K. Wilcox, A. Wolfson, S.K. Wolk, C. Zhang, D. Zichi, *PLoS One* 5 (12) (2010) e15004.
- [35] M. Zuker, *Nucleic Acids Res.* 31 (13) (2003) 3406–3415.
- [36] M. Sassanfar, J.W. Szostak, *Nature* 364 (6437) (1993) 550–553.
- [37] D.E. Huizenga, J.W. Szostak, *Biochemistry* 34 (2) (1995) 656–665.
- [38] C.H. Lin, D.J. Patel, *Chem. Biol.* 4 (11) (1997) 817–832.
- [39] M.M.K. Vu, N.E. Jameson, S.J. Masuda, D. Lin, R. Larralde-Ridaura, A. Lupták, *Chem. Biol.* 19 (10) (2012) 1247–1254.
- [40] P.L. Sazani, R. Larralde, J.W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (27) (2004) 8370–8371.
- [41] G. Durand, S. Lisi, C. Ravelet, E. Dausse, E. Peyrin, J.-J. Toulmé, *Angew. Chem., Int. Ed.* 53 (27) (2014) 6942–6945.

IV. Discussion

IV. Discussion

1. Sélection d'aptamères anti-adénine

Les résultats obtenus sont présentés et discutés au niveau de l'article joint ci-dessus, ils seront repris succinctement dans cette section afin de permettre la compréhension de quelques éléments additionnels.

En effet, dans le cadre de notre projet, nous avons opté pour une banque ADN incorporant le 5'-(octa1, 7-diynyl) 2'-deoxyuridine triphosphate (dODTP) pour sélectionner un aptamère capable de lier l'adénine en présence de 25 % de méthanol. Après 11 tours de sélection amplification en présence de 25 % de méthanol, les séquences sont clonées et séquencées. La population est évaluée par capture sur des billes adénines ; l'aptamère présentant les meilleures propriétés de fixation en présence de méthanol est choisi pour être étudié, ce dernier est appelé A'12.

L'aptamère A'12 est capable de lier efficacement l'adénine en présence de méthanol, mais aussi en l'absence du solvant. La constante de dissociation calculée en présence de 25 % de méthanol est de $12,47 \pm 0,37 \mu\text{M}$; l'affinité de l'aptamère A'12 est dans le même ordre de grandeur (μM) que celles des aptamères qui lient des petites molécules²⁻⁴.

2. Evaluation des versions raccourcies de l'aptamère anti-adénine

Nous avons étudié les différentes versions tronquées de l'aptamère A'12 : A'12a, A'12b, A'12c (voir la figure 6 de l'article). L'aptamère A'12a est capable de lier l'adénine uniquement en milieu aqueux, contrairement à l'aptamère A'12b, qui présente de meilleures propriétés de fixation en présence du solvant organique.

Quant à l'aptamère A'12c, il englobe la séquence de A'12a et A'12b, il lie l'adénine efficacement en présence et en absence de 25 % de méthanol. La constante de dissociation de l'aptamère A'12c est déterminée dans un premier temps en utilisant la capture sur des billes adénines, ensuite en solution par la méthode de polarisation de fluorescence ; en utilisant le conjugué adénine-fluorescéine (voir la figure 1 de l'article). L'intensité du signal de polarisation de fluorescence obtenue est considéré comme étant faible (12 mp). Cependant, la variation du signal de polarisation en présence de concentrations croissantes en aptamère semble correcte, car la courbe obtenue est assez proche de celle obtenue avec la méthode de capture sur des billes adénines ; les constantes de dissociation sont proches : $60,9 \pm 6,0 \mu\text{M}$.

La diminution de l'intensité du signal de polarisation pourrait être attribuée à la nature du lien chimique entre l'adénine et la fluorescéine ou à la fluorescéine elle-même, car les rotations effectuées en solution par cette dernière ne seraient pas adaptées à notre système⁵⁻⁷. De même, la présence de purines au site de fixation de l'adénine contribuerait probablement à l'extinction du signal de fluorescence. Ainsi, pour

optimiser l'intensité du signal de polarisation de fluorescence, il est possible dans un premier temps d'explorer d'autres fluorophores comme le Texas Red.

3. Perspectives

3.1 Stratégies d'optimisation de l'aptamère raccourci A'12c

Le but ultime de notre projet est de développer un aptamère biocapteur capable de lier un marqueur de chimie prébiotique comme l'adénine et d'opérer en présence de 25 % de méthanol.

L'aptamère A'12c pourrait être exploité comme module de reconnaissance pour le développement d'un biocapteur opérationnel en présence de méthanol. Des optimisations préalables pourraient être effectuées, car l'affinité de ce dernier diminue d'un facteur ≈ 5 par rapport à l'aptamère pleine taille.

L'optimisation de ce dernier pourrait s'effectuer sur deux critères : l'affinité et la tolérance à des concentrations plus élevées en méthanol.

La stratégie de randomisation segmentaireⁱⁱ pourrait être envisagée comme stratégie d'optimisation : des parties de la séquence de l'aptamère A'12c pourraient être remplacées par des segments aléatoires. Il est préférable d'éviter la randomisation des boucles purines pour prévenir l'altération totale de la reconnaissance moléculaire ; les parties qui formeraient des duplexes, selon la prédiction de structure, constitueraient des cibles potentielles, pour générer une population ADN à partir de l'aptamère A'12c.

Des groupements hydrophobes⁹⁵ pourraient être associés sur l'extrémité 5' de la population ADN et, ainsi, effectuer un SELEX de type « blended ». Une autre approche de sélection pourrait être envisagée, il s'agit d'explorer d'autres nucléotides modifiés et de les incorporer durant le processus de sélection/amplification à la place du dDOTP⁹⁶, ou bien de garder ce dernier et d'incorporer des groupements hydrophobes par la réaction de « chimie click »⁹⁷.

Indépendamment de la stratégie SELEX adoptée, après chaque tour de sélection, la concentration de méthanol pourrait être augmentée et /ou la concentration en adénine pourrait être diminuée ; il est aussi possible d'effectuer un contre-SELEX en utilisant des molécules dont la structure est proche de celle de l'adénine, comme l'hypoxanthine.

3.2 Stratégie de développement de biocapteurs

En plus de l'optimisation de l'aptamère A'12c, il est nécessaire d'évaluer l'adaptabilité de la stratégie de conception à nos conditions opérationnelles : nous avons opté pour la stratégie chimérique qui exploite les complexes « kissing » ARN comme des modules de transduction spécifiques^{81,98} (figure 32) ; la méthode de détection envisagée est monochromophore, basée sur la mesure de la variation de polarisation de fluorescence.

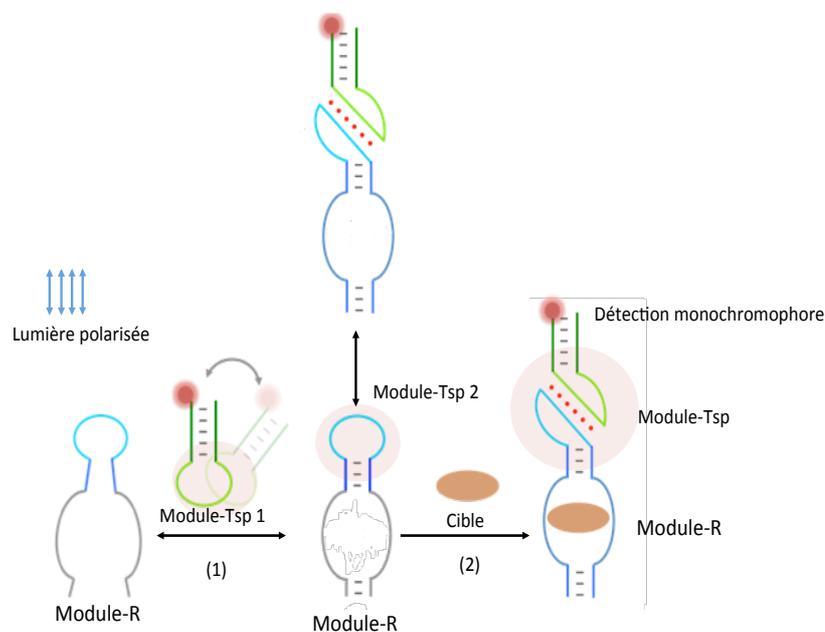


Figure 32 : Stratégie de production de biocapteurs

En l'absence de la cible, les différentes conformations sont équilibrées (1) ; en présence de la cible (2), l'équilibre serait déplacé vers la conformation permettant la formation du complexe « kissing » et, par conséquent, de mesurer une variation de polarisation de fluorescence.

3. 2. 1 Evaluation de la stabilité des complexes « kissing » en présence de méthanol

Avant d'associer l'aptamère A'12 ou A'12c aux modules de transduction, il est nécessaire de vérifier les propriétés de reconnaissance de ces derniers en présence du méthanol. Le complexe « kissing » ARN KC24/KG51 est choisi pour l'évaluation en présence de méthanol. Les deux ARN sont structurés en tiges-boucles ; deux variants de l'ARN KC24 ont été utilisés : le KC 24-18 comporte une tige formée de 6 paires de bases et une boucle, de 6 bases ; le KC24-16 comporte une tige formée de 5 paires de bases et une boucle formée de 6 bases. L'ARN KG51 est formé de 6 paires de bases et d'une boucle apicale de 6 bases, l'extrémité 5' de ce dernier est marquée à la fluorescéine ; la figure 33A montre les séquences et les structures des ARN KC24 et KG51.

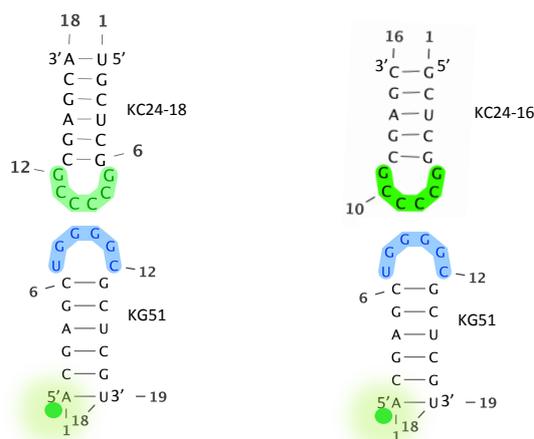
3. 2. 2 Méthode d'évaluation des complexes« kissing » en présence de méthanol

Les complexes sont chauffés pendant 3 min à 65°C, refroidis 2 min à 4°C et restructurés à température ambiante dans le tampon SEIX qui contient : 20 mM HEPES à pH 7,4,

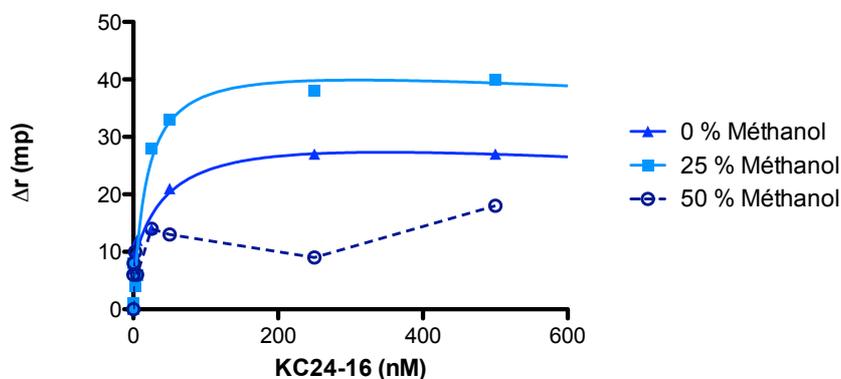
20 mM de $C_2H_3NaO_2$, 140 mM de $C_2H_3KO_2$, 10 mM $Mg(C_2H_3O_2)_2$ et 0 %, 25 % ou 50 % de méthanol. Le KG51 marqué à la fluorescéine est présent à une concentration constante de 5 nM, le KC24-18 ou le KC24-16 sont rajoutés à des concentrations croissantes de 0-500 nM. Les mesures de polarisation de fluorescence ont été effectuées sur des plaques 96 puits Greiner Bio-One par un appareil TECAN INFINITE M1000PRO, la longueur d'onde d'excitation est fixée à $470 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ et le signal d'émission a été recueilli $525 \pm 5 \text{ nm}$.

3. 2. 3 Résultats préliminaires

A.



B.



C.

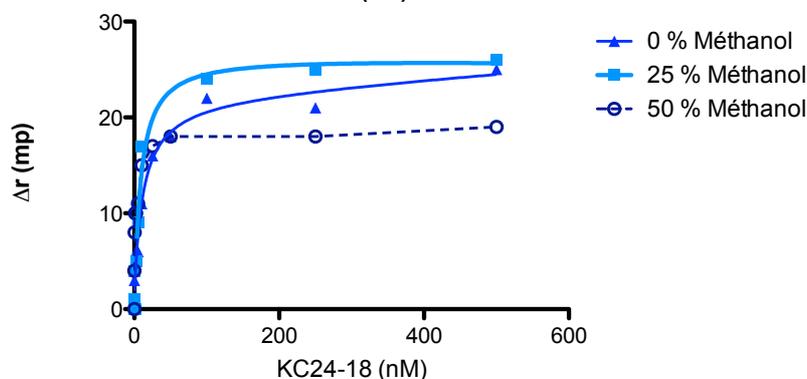


Figure 33 : Evaluation de la formation de complexes « kissing » avec la méthode de polarisation de fluorescence^{94, 99} en présence de concentrations variables en méthanol.

A) séquences des ARN KC24-16, KC24-18 et KG51 ; B) Evaluation de la formation du complexe « kissing » KC24-16 / KG51 ; C) Evaluation de la formation du complexe « kissing » KC24-18/ KG51.

Les deux variants KC24-18 et KC24-16 forment des complexes avec le KG51 en présence de 0 % et 25 % de méthanol ; en présence de 50 % de méthanol, les complexes se forment, mais ils ne sont pas stables, de grandes variations sont observées et les données ne sont pas exploitables pour calculer une constante de dissociation. Le tableau 3 montre les différentes constantes de dissociation obtenues. L'équation utilisée pour tracer les courbes et déterminer les Kd est la suivante : $y = (B_{max} * X) / (K_d + X)$; Bmax représente la valeur du signal maximal de liaisons spécifiques.

	0%	25%	50%
	Méthanol	Méthanol	Méthanol
Kd KG51/KC24-16	35 ± 33 nM	25,8 ± 18 nM	-
Kd KG51/KC24-18	7,5±4,5 nM	10 ± 8,3 nM	-

Tableaux 3 : constantes de dissociation des complexes « kissing » KC24/KG51 en présence et en absence de méthanol.

3. 2. 4 Analyse des résultats préliminaires

Le développement de biocapteurs chimériques exploitant les complexes « kissing » comme modules de transduction spécifiques repose initialement sur la réduction du nombre de paires de bases qui forment les parties duplexes⁸¹ (figure 15) des complexes « kissing ».

La délétion d'une paire de base unique au niveau du KC24-18 provoque une réduction de l'affinité d'un facteur $\approx 4,6$ (KC24-16) en absence de méthanol. En présence de 25 % de méthanol, l'affinité du KC24-16 est réduite d'un facteur $\approx 2,5$ par rapport au KC24-18. Ces résultats suggèrent que le méthanol ne constituerait pas un facteur limitant pour le développement d'un biocapteur chimérique opérationnel en présence de méthanol, l'étape suivante serait de développer de différents variants KC24/A'12C et KG51.

V. Conclusion

V. Conclusion

La sélection en présence de méthanol s'est révélée efficace pour sélectionner des aptamères ayant les propriétés de reconnaissance de l'adénine. L'incorporation du dODTP est indispensable pour l'interaction, quel que soit le milieu ou la séquence testés. Son remplacement par le dTTP résulte en une diminution considérable de l'efficacité de liaison à l'adénine. Mais le dODTP ne rend pas compte à lui seul de l'efficacité de liaison en présence de méthanol.

L'analyse des structures secondaires et l'efficacité de liaison à l'adénine des candidats sélectionnés ont permis d'avoir des indications sur les motifs structuraux requis, il s'agit de l'organisation en deux boucles. Des méthodes d'analyse de structure, telles la cristallographie et la RMN, pourraient permettre de confirmer les résultats précédents et d'obtenir un modèle d'interaction moléculaire.

L'aptamère A'12 et A'12c pourrait être soumis aux tests de radiations cosmiques et leurs affinités pour l'adénine devraient être réévaluées. La stratégie SELEX utilisée pourrait être adoptée pour le développement d'autres aptamères capables de reconnaître d'autres marqueurs de chimie prébiotique. Les structures identifiées pourraient permettre de concevoir un biocapteur fonctionnel en présence de méthanol et/ou en l'absence de ce dernier.

Nous avons montré que le complexe « kissing » KC24/KG51 est stable en présence de 25 % de méthanol, par conséquent, ce dernier pourrait être utilisé comme module de transduction spécifique pour concevoir un biocapteur opérationnel en présence de méthanol, et cela en association avec l'aptamère A'12.

L'activité de transduction en aval des complexes « kissing » ARN a été démontrée ⁸¹, cependant, il serait essentiel de démontrer l'activité de transduction en amont ; en effet, l'association du KG51 avec un aptamère fluorogène^{72, 103} pourrait constituer une stratégie pour démontrer la faisabilité de ce concept d'une part, et d'autre part permettre de concevoir un système biocapteur intégral (figure 34) capable d'émettre un signal optimal exclusivement en présence de la cible.

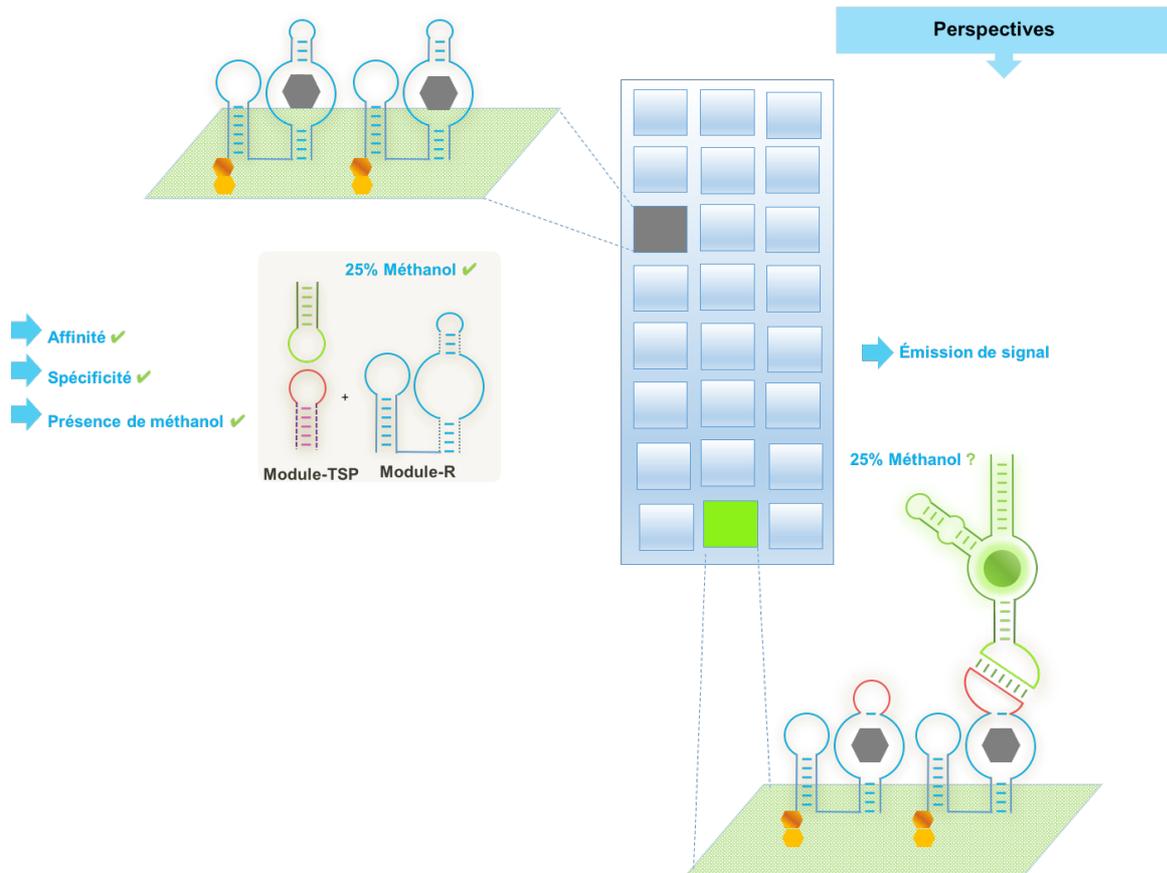


Figure 34 : schéma récapitulatif du travail réalisé et des perspectives

VI. Références bibliographiques

VI. Références bibliographiques

1. Orgel, L. E. Evolution of the genetic apparatus. *J. Mol. Biol.* 38, 381–393 (1968).
2. Sulston, J., Lohrmann, R., Orgel, L. E. & Miles, H. T. Nonenzymatic synthesis of oligoadenylates on a polyuridylic acid template. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 59, 726–733 (1968).
3. Crick, F. H. The origin of the genetic code. *J. Mol. Biol.* 38, 367–379 (1968).
4. Cech, T. R., Zaug, A. J. & Grabowski, P. J. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of tetrahymena: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 27, 487–496 (1981).
5. Kruger, K. et al. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena. *Cell* 31, 147–157 (1982).
6. Westheimer, F. H. Biochemistry: Polyribonucleic acids as enzymes. *Nature* 319, 534–536 (1986).
7. Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. & Altman, S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35, 849–857 (1983).
8. Gilbert, W. Origin of life: The RNA world. *Nature* 319, 618 (1986).
9. Joyce, G. F. RNA evolution and the origins of life. *Nature* 338, 217–224 (1989).
10. Robertson, D. L. & Joyce, G. F. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* 344, 467–468 (1990).
11. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505–510 (1990).
12. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818–822 (1990).
13. Joyce, G. F. & Inoue, T. A novel technique for the rapid preparation of mutant RNAs. *Nucleic Acids Res.* 17, 711–722 (1989).
14. Schneider, D., Tuerk, C. & Gold, L. Selection of high affinity RNA ligands to the bacteriophage R17 coat protein. *J. Mol. Biol.* 228, 862–869 (1992).
15. Bartel, D. P., Zapp, M. L., Green, M. R. & Szostak, J. W. HIV-1 rev regulation involves recognition of non-Watson-Crick base pairs in viral RNA. *Cell* 67, 529–536 (1991).
16. Tuerk, C., MacDougal, S. & Gold, L. RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 6988–6992 (1992).
17. Jellinek, D., Lynott, C. K., Rifkin, D. B. & Janjić, N. High-affinity RNA ligands to basic fibroblast growth factor inhibit receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 11227–11231 (1993).
18. Connell, G. J., Illangesekare, M. & Yarus, M. Three small ribooligonucleotides

- with specific arginine sites. *Biochemistry (Mosc.)* 32, 5497–5502 (1993).
19. Sassanfar, M. & Szostak, J. W. An RNA motif that binds ATP. *Nature* 364, 550–553 (1993).
 20. Famulok, M. & Szostak, J. W. Stereospecific recognition of tryptophan agarose by in vitro selected RNA. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 3990–3991 (1992).
 21. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature* 355, 850–852 (1992).
 22. Marshall, K. A. & Ellington, A. D. in *RNA-Ligand Interactions Part B Volume 318*, 193–214 (Academic Press, 2000).
 23. Nutiu, R. & Li, Y. Aptamers with fluorescence-signaling properties. *Methods* 37, 16–25 (2005).
 24. Hall, B. et al. in *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., 2001).
 25. Sorrentino, S. The eight human ‘canonical’ ribonucleases: Molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Lett.* 584, 2194–2200 (2010).
 26. Koizumi, T. Tissue distribution of deoxyribonuclease I (DNase I) activity level in mice and its sexual dimorphism. *Exp. Anim. Jpn. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 44, 181–185 (1995).
 27. Lin, Y., Qiu, Q., Gill, S. C. & Jayasena, S. D. Modified RNA sequence pools for in vitro selection. *Nucleic Acids Res.* 22, 5229–5234 (1994).
 28. Green, L. S. et al. Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Chem. Biol.* 2, 683–695 (1995).
 29. Eaton, B. E., Gold, L. & Zichi, D. A. Let’s get specific: the relationship between specificity and affinity. *Chem. Biol.* 2, 633–638 (1995).
 30. Ruckman, J. et al. 2′-Fluoropyrimidine RNA-based Aptamers to the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165) inhibition of receptor binding and vegf-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.* 273, 20556–20567 (1998).
 31. Aurup, H., Tuschl, T., Benseler, F., Ludwig, J. & Eckstein, F. Oligonucleotide duplexes containing 2′-amino-2′-deoxycytidines: thermal stability and chemical reactivity. *Nucleic Acids Res.* 22, 20–24 (1994).
 32. Cummins, L. L. et al. Characterization of fully 2′-modified oligoribonucleotide hetero- and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity. *Nucleic Acids Res.* 23, 2019–2024 (1995).
 33. Koshkin, Nielsen, Meldgaard, Rajwanshi, Singh, Wengel, A., Poul, Michael,

- Vivek K, Sanjay K, Jesper. LNA (Locked Nucleic Acid): An RNA Mimic Forming Exceedingly Stable LNA:LNA Duplexes. 13252–13253 (1998).
34. Darfeuille, F., Bo Hansen, J., Orum, H., Di Primo, C. & Toulmé, J.-J. LNA/DNA chimeric oligomers mimic RNA aptamers targeted to the TAR RNA element of HIV-1. *Nucleic Acids Res.* 32, 3101–3107 (2004).
 35. Jhaveri, S., Olwin, B. & Ellington, A. D. In vitro selection of phosphorothiolated aptamers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 2285–2290 (1998).
 36. Somasunderam, A. et al. Combinatorial Selection, Inhibition and Antiviral Activity of DNA Thioaptamers Targeting the RNase H Domain of HIV-1 Reverse Transcriptase. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 10388–10395 (2005).
 37. Lato, S. M. et al. Boron-containing aptamers to ATP. *Nucleic Acids Res.* 30, 1401–1407 (2002).
 38. Latham, J. A., Johnson, R. & Toole, J. J. The application of a modified nucleotide in aptamer selection: novel thrombin aptamers containing 5-(1-pentynyl)-2'-deoxyuridine. *Nucleic Acids Res.* 22, 2817–2822 (1994).
 39. Bock, L. C., Griffin, L. C., Latham, J. A., Vermaas, E. H. & Toole, J. J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* 355, 564–566 (1992).
 40. Kraemer, S. et al. From SOMAmer-Based Biomarker Discovery to Diagnostic and Clinical Applications: A SOMAmer-Based, Streamlined Multiplex Proteomic Assay. *PLoS ONE* 6, e26332 (2011).
 41. Gold, L. et al. Aptamer-Based Multiplexed Proteomic Technology for Biomarker Discovery. *PLoS ONE* 5, e15004 (2010).
 42. Shoji, A., Kuwahara, M., Ozaki, H. & Sawai, H. Modified DNA Aptamer That Binds the (R)-Isomer of a Thalidomide Derivative with High Enantioselectivity. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 1456–1464 (2007).
 43. Willis, M. C., Hicke, B. J., Uhlenbeck, O. C., Cech, T. R. & Koch, T. H. Photocrosslinking of 5-iodouracil-substituted RNA and DNA to proteins. *Science* 262, 1255–1257 (1993).
 44. Jensen, K. B., Atkinson, B. L., Willis, M. C., Koch, T. H. & Gold, L. Using in vitro selection to direct the covalent attachment of human immunodeficiency virus type I Rev protein to high-affinity RNA ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 12220–12224 (1995).
 45. Smith, D., Kirschenheuter, G. P., Charlton, J., Guidot, D. M. & Repine, J. E. In vitro selection of RNA-based irreversible inhibitors of human neutrophil elastase. *Chem. Biol.* 2, 741–750 (1995).
 46. Klußmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V. A. & Fürste, J. P. Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat. Biotechnol.* 14, 1112–1115 (1996).

47. Vater, A. & Klussmann, S. Turning mirror-image oligonucleotides into drugs: the evolution of Spiegelmer® therapeutics. *Drug Discov. Today* doi:10.1016/j.drudis.2014.09.004
48. Jenison, R. D., Gill, S. C., Pardi, A. & Polisky, B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* 263, 1425–1429 (1994).
49. Geiger, A., Burgstaller, P., Eltz, H. von der, Roeder, A. & Famulok, M. RNA Aptamers That Bind L-Arginine with Sub-Micromolar Dissociation Constants and High Enantioselectivity. *Nucleic Acids Res.* 24, 1029–1036 (1996).
50. Mann, A. P. et al. Identification of Thioaptamer Ligand against E-Selectin: Potential Application for Inflamed Vasculature Targeting. *PLoS ONE* 5, e13050 (2010).
51. Berezovski, M. et al. Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures : A Universal Tool for Development of Aptamers. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 3165–3171 (2005).
52. Nitsche, A. et al. One-step selection of Vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX. *BMC Biotechnol.* 7, 48 (2007).
53. Tolle, F., Wilke, J., Wengel, J. & Mayer, G. By-Product Formation in Repetitive PCR Amplification of DNA Libraries during SELEX. *PLoS ONE* 9, (2014).
54. Piccirilli, J. A., Benner, S. A., Krauch, T. & Moroney, S. E. Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA extends the genetic alphabet. *Nature* 343, 33–37 (1990).
55. Pinheiro, V. B. et al. Synthetic Genetic Polymers Capable of Heredity and Evolution. *Science* 336, 341–344 (2012).
56. Pardue, M. L. & Gall, J. G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 64, 600–604 (1969).
57. Tyagi, S. & Kramer, F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 14, 303–308 (1996).
58. Hermann, T. & Patel, D. J. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science* 287, 820–825 (2000).
59. Weigand, J. E. & Suess, B. Aptamers and riboswitches: perspectives in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 229–236 (2009).
60. Huizenga, D. E. & Szostak, J. W. A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry (Mosc.)* 34, 656–665 (1995).
61. Jhaveri, S. D. et al. Designed Signaling Aptamers that Transduce Molecular Recognition to Changes in Fluorescence Intensity. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 2469–2473 (2000).
62. Macaya, R. F., Schultze, P., Smith, F. W., Roe, J. A. & Feigon, J. Thrombin-binding

- DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 3745–3749 (1993).
63. Potyrailo, R. A., Conrad, R. C., Ellington, A. D. & Hieftje, G. M. Adapting Selected Nucleic Acid Ligands (Aptamers) to Biosensors. *Anal. Chem.* 70, 3419–3425 (1998).
 64. Hamaguchi, N., Ellington, A. & Stanton, M. Aptamer Beacons for the Direct Detection of Proteins. *Anal. Biochem.* 294, 126–131 (2001).
 65. Yamamoto, R. & Kumar, P. K. R. Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of Tat protein of HIV-1. *Genes Cells* 5, 389–396 (2000).
 66. Yamamoto, R. et al. In vitro selection of RNA aptamers that can bind specifically to Tat protein of HIV-1. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 145–146 (1995).
 67. Nutiu, R., Yu, J. M. Y. & Li, Y. Signaling Aptamers for Monitoring Enzymatic Activity and for Inhibitor Screening. *ChemBioChem* 5, 1139–1144 (2004).
 68. Nutiu, R. & Li, Y. Structure-Switching Signaling Aptamers. *J Am Chem Soc* 125, 4771–4778 (2003).
 69. Nutiu, R. & Li, Y. Structure - Switching Signaling Aptamers: Transducing Molecular Recognition into Fluorescence Signaling. *Chem. - Eur. J.* 10, 1868–1876 (2004).
 70. Nutiu, R. & Li, Y. Structure-Switching Signaling Aptamers. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 4771–4778 (2003).
 71. Paige, J. S., Wu, K. Y. & Jaffrey, S. R. RNA Mimics of Green Fluorescent Protein. *Science* 333, 642–646 (2011).
 72. Strack, R. L., Song, W. & Jaffrey, S. R. Using Spinach-based sensors for fluorescence imaging of intracellular metabolites and proteins in living bacteria. *Nat. Protoc.* 9, 146–155 (2014).
 73. You, M., Litke, J. L. & Jaffrey, S. R. Imaging metabolite dynamics in living cells using a Spinach-based riboswitch. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201504354 (2015).
doi:10.1073/pnas.1504354112
 74. Paige, J. S., Nguyen-Duc, T., Song, W. & Jaffrey, S. R. Fluorescence Imaging of Cellular Metabolites with RNA. *Science* 335, 1194–1194 (2012).
 75. Breaker, R. R. Riboswitches and the RNA World. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, (2012).
 76. Desvergne, B., Michalik, L. & Wahli, W. Transcriptional Regulation of Metabolism. *Physiol. Rev.* 86, 465–514 (2006).
 77. Yamamoto, R., Baba, T. & Kumar, P. K. Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of Tat protein of HIV-1. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 5, 389–396 (2000).
 78. Ducongé, F. & Toulmé, J. J. In vitro selection identifies key determinants for loop-loop interactions: RNA aptamers selective for the TAR RNA element of HIV-1.

RNA 5, 1605–1614 (1999).

79. Chen, A. A. & García, A. E. Mechanism of enhanced mechanical stability of a minimal RNA kissing complex elucidated by nonequilibrium molecular dynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E1530–E1539 (2012).
80. Eguchi, Y. & Tomizawa, J. Complexes formed by complementary RNA stem-loops. Their formations, structures and interaction with ColE1 Rom protein. *J. Mol. Biol.* 220, 831–842 (1991).
81. Durand, G. et al. Riboswitches Based on Kissing Complexes for the Detection of Small Ligands. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 6942–6945 (2014).
82. Davis, J. H. Isolation of high-affinity GTP aptamers from partially structured RNA libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 11616–11621 (2002).
83. Herskovits, T. T. Nonaqueous solutions of DNA: Factors determining the stability of the helical configuration in solution. *Arch. Biochem. Biophys.* 97, 474–484 (1962).
84. Chiesl, T. N. et al. Enhanced amine and amino acid analysis using Pacific Blue and the Mars Organic Analyzer microchip capillary electrophoresis system. *Anal. Chem.* 81, 2537–2544 (2009).
85. Shim, W.-B., Kim, M. J., Mun, H. & Kim, M.-G. An aptamer-based dipstick assay for the rapid and simple detection of aflatoxin B₁. *Biosens. Bioelectron.* 62, 288–294 (2014).
86. Gierlich, J., Burley, G. A., Gramlich, P. M. E., Hammond, D. M. & Carell, T. Click Chemistry as a Reliable Method for the High-Density Postsynthetic Functionalization of Alkyne-Modified DNA. *Org. Lett.* 8, 3639–3642 (2006).
87. Franklin, M. C., Wang, J. & Steitz, T. A. Structure of the Replicating Complex of a Pol α Family DNA Polymerase. *Cell* 105, 657–667 (2001).
88. Rodriguez, A. C., Park, H.-W., Mao, C. & Beese, L. S. Crystal structure of a pol α family DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. 9^oN-7. *J. Mol. Biol.* 299, 447–462 (2000).
89. Lee, S. E. et al. Enhancing the catalytic repertoire of nucleic acids: a systematic study of linker length and rigidity. *Nucleic Acids Res.* 29, 1565–1573 (2001).
90. Feigon, J., Dieckmann, T. & Smith, F. W. Aptamer structures from A to ζ . *Chem. Biol.* 3, 611–617 (1996).
91. Kinoshita, K., Kawato, S. & Ikegami, A. A theory of fluorescence polarization decay in membranes. *Biophys. J.* 20, 289–305 (1977).
92. Lipari, G. & Szabo, A. Effect of librational motion on fluorescence depolarization and nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules and membranes.

Biophys. J. 30, 489–506 (1980).

93. Famulok, M. Molecular Recognition of Amino Acids by RNA-Aptamers: An L-Citrulline Binding RNA Motif and Its Evolution into an L-Arginine Binder. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 1698–1706 (1994).
94. Hafner, M. et al. Displacement of protein-bound aptamers with small molecules screened by fluorescence polarization. *Nat. Protoc.* 3, 579–587 (2008).
95. Shibata, T., Dohno, C. & Nakatani, K. G-quadruplex formation of entirely hydrophobic DNA in organic solvents. *Chem. Commun.* 49, 5501–5503 (2013).
96. Davies, D. R. et al. Unique motifs and hydrophobic interactions shape the binding of modified DNA ligands to protein targets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 19971–19976 (2012).
97. Tolle, F., Brändle, G. M., Matzner, D. & Mayer, G. A Versatile Approach Towards Nucleobase-Modified Aptamers. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 10971–10974 (2015).
98. Goux, E. et al. An improved design of the kissing complex-based aptasensor for the detection of adenosine. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 6515–6524 (2015).
99. Moerke, N. J. in *Current Protocols in Chemical Biology* (John Wiley & Sons, Inc., 2009).
100. Bouchard, P. & Legault, P. A remarkably stable kissing-loop interaction defines substrate recognition by the *Neurospora Varkud* Satellite ribozyme. *RNA* (2014). doi:10.1261/rna.046144.114
101. Laughrea, M. & Jetté, L. Kissing-Loop Model of HIV-1 Genome Dimerization: HIV-1 RNAs Can Assume Alternative Dimeric Forms, and All Sequences Upstream or Downstream of Hairpin 248–271 Are Dispensable for Dimer Formation. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 1589–1598 (1996).
102. Tyrrell, J., Weeks, K. M. & Pielak, G. J. Challenge of mimicking the influences of the cellular environment on RNA structure by PEG-induced macromolecular crowding. *Biochemistry (Mosc.)* (2015). doi:10.1021/acs.biochem.5b00767
103. Kolpashchikov, D. M. Binary malachite green aptamer for fluorescent detection of nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 12442–12443 (2005).
104. Vandenabeele-Trambouze, O. et al. Comparison of Methods for Measurement of Organic Compounds at Ultra-Trace Level: Analytical Criteria and Application to Analysis of Amino Acids in Extraterrestrial Samples. *Astrobiology* 5, 48–65 (2005).
105. Cho, E. J., Collett, J. R., Szafranska, A. E. & Ellington, A. D. Optimization of aptamer microarray technology for multiple protein targets. *Anal. Chim. Acta* 564, 82–90 (2006).

106. Le Postollec, A. *et al.* Investigation of neutron radiation effects on polyclonal antibodies (IgG) and fluorescein dye for astrobiology applications. *Astrobiology* **9**, 637–645 (2009).

107. Baqué, M. *et al.* Biochip for astrobiological applications : Investigation of low energy protons effects on antibody performances. *Planet. Space Sci.* **59**, 1490–1497

108. BAQUE, M. *et al.* Investigation of Low-Energy Proton Effects on Aptamer Performance for Astrobiological Applications. *Astrobiology* **11**, 207–211 (2011).

.