

## Influence de la longueur de l'aptamère sur le processus de reconnaissance

Jusqu'ici, ces travaux ont permis de déterminer les paramètres caractéristiques d'une reconnaissance entre un aptamère et sa cible par voie électrochimique. Mais ces méthodologies de détection d'une complexation aptamère/cible fournissent aussi des résultats qualitatifs sur la spécificité de la séquence d'aptamère utilisée. En combinant une approche basée sur la prédiction des structures tertiaires de l'aptamère (qui dépendent de la séquence nucléotidique) et l'utilisation de ces méthodologies, la séquence de l'aptamère anti-L-Tym a pu être optimisée.

### IV-1- Structure secondaire de l'aptamère anti-L-Tym

#### a. Hypothèse de départ : le G-quartet

Au sein de la séquence d'aptamère anti-L-Tym se trouvent quatre doublets de guanine susceptibles de former une structure en G-quartet (5'-AATTCGCTAGCTGGAGCTTGGATTGATGTGGTGTGTGAGTGC GG TGCCC-3'). Ces quadruplexes sont connus pour se former en présence d'un ion monovalent entre chaque plan de quatre guanines. Des études sur la stabilité de cette structure montrent qu'en présence d'ions  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  les quartets ont des topologies<sup>211</sup>, et des températures de fusion ( $T_m$ ) différentes. Ainsi, les quadruplexes de guanines présentent des  $T_m$  plus élevés en présence de  $\text{K}^+$  qu'en présence de  $\text{Na}^+$ . En présence d'un ion encore plus petit, le  $\text{Li}^+$ , la  $T_m$  est encore plus basse<sup>212</sup>. Nous avons donc envisagé de tirer partie de la méthodologie électrochimique décrite précédemment pour tester l'hypothèse de formation d'un G-quartet en évaluant la reconnaissance de l'aptamère vis-à-vis de sa cible dans des tampons contenant exclusivement soit du  $\text{K}^+$ , du  $\text{Na}^+$  ou du  $\text{Li}^+$ . Le tampon de reconnaissance utilisé jusqu'à présent est constitué d'un mélange de 5 mM de Tris pH 7,4, 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  et 50mM de  $\text{NaCl}$ . Des tampons à 50 mM de  $\text{KCl}$  et  $\text{LiCl}$  ont donc été préparés, et des expériences de reconnaissance directe de la L-Tym réalisées.

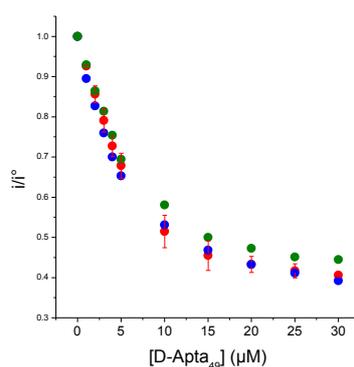


Fig 86 : Représentation graphique  $i/i^\circ = f([D\text{-apta}_{49}])$  pour les tampons contenant l'ion  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Li}^+$   
 $[L\text{-Tym}] = 5 \mu\text{M}$ ,  $[\text{Os}^{\text{III/II}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+} = 1 \mu\text{M}$ .

Comme représenté sur la figure 86, quel que soit la nature de l'ion monovalent utilisé, aucune différence d'affinité de l'aptamère pour sa cible n'a pu être révélée. L'hypothèse d'un quadruplexe de guanine n'est cependant pas à exclure définitivement. En effet, aucune information n'indique si la formation d'un G-quartet n'est pas le produit final d'un processus de reconnaissance induit lors de la

complexation de la cible. De ce fait, seule l'hypothèse d'une préstructuration en quadruplexe peut être rejetée.

### b. Appariement Watson-Crick

La séquence de 49 nucléotides comprenant 14 % de A, 31 % de T, 16 % de C et 39 % de G, des appariements de type Watson-Crick sont susceptibles de se produire. Le logiciel *mfold* permet de prédire quatre structures secondaires (Fig 87).

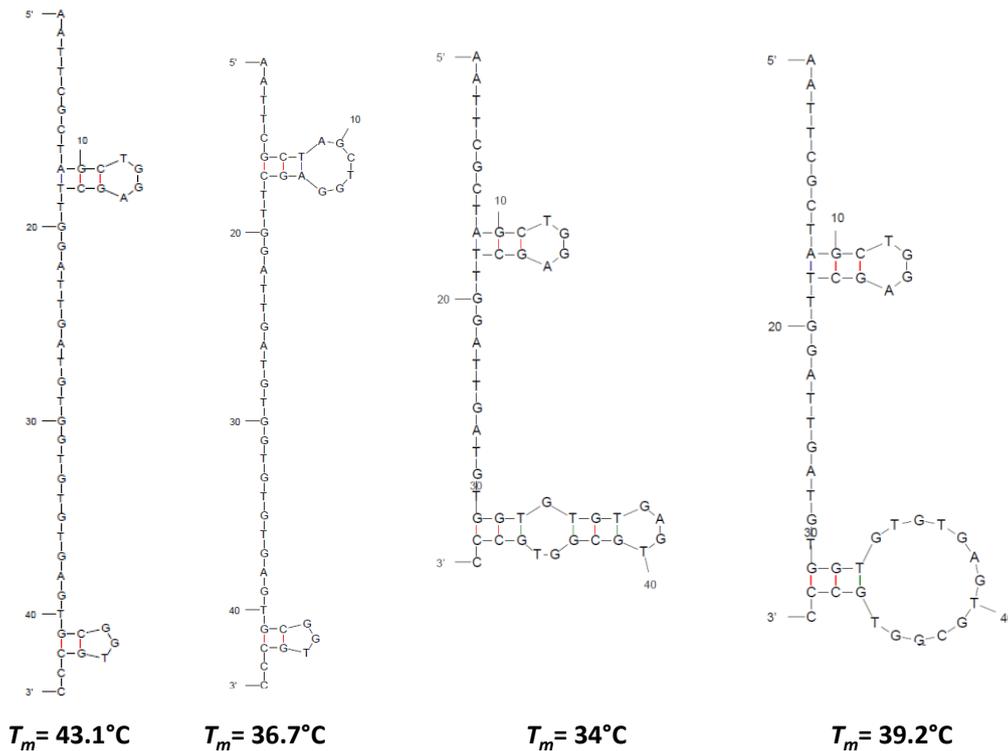


Fig 87 : structures secondaires calculées par *mfold* : en rouge les appariements de type Watson-Crick, en vert les appariements Wobble

Ces structures secondaires possèdent des appariements des côtés 5' et 3' de la séquence, impliquant moins de 5 appariements de type Watson-Crick. Les températures de fusion étant néanmoins au-dessus de la température ambiante, ces appariements sont susceptibles de coexister.

D'après cette simulation, le monobrin d'ADN n'a donc pas de structuration dominante en double hélice. Toutefois, ces interactions ne sont pas les seules susceptibles de structurer la séquence. Comme évoqué dans le chapitre I, des appariements de type Hoogsteen, des interactions de type  $\pi$ -stacking ou encore des interactions guanine-phosphate peuvent se produire et contraindre l'aptamère à coexister sous diverses conformations secondaires et tertiaires non prises en compte par ce logiciel. Cette simulation a néanmoins l'avantage de proposer une structuration largement rencontrée dans le domaine des aptamères : la structure en tige-boucle. Pour des aptamères dirigés contre des acides aminés ou contre de petites molécules organiques, cette structure présente souvent un site de fixation dans la zone non appariée de la séquence, c'est-à-dire dans la boucle.

Quatre structures en tige boucle différentes (TB 1, 2, 3 et 4, fig 88) sont ainsi identifiées dans le cas de l'aptamère anti *L-Tym*.

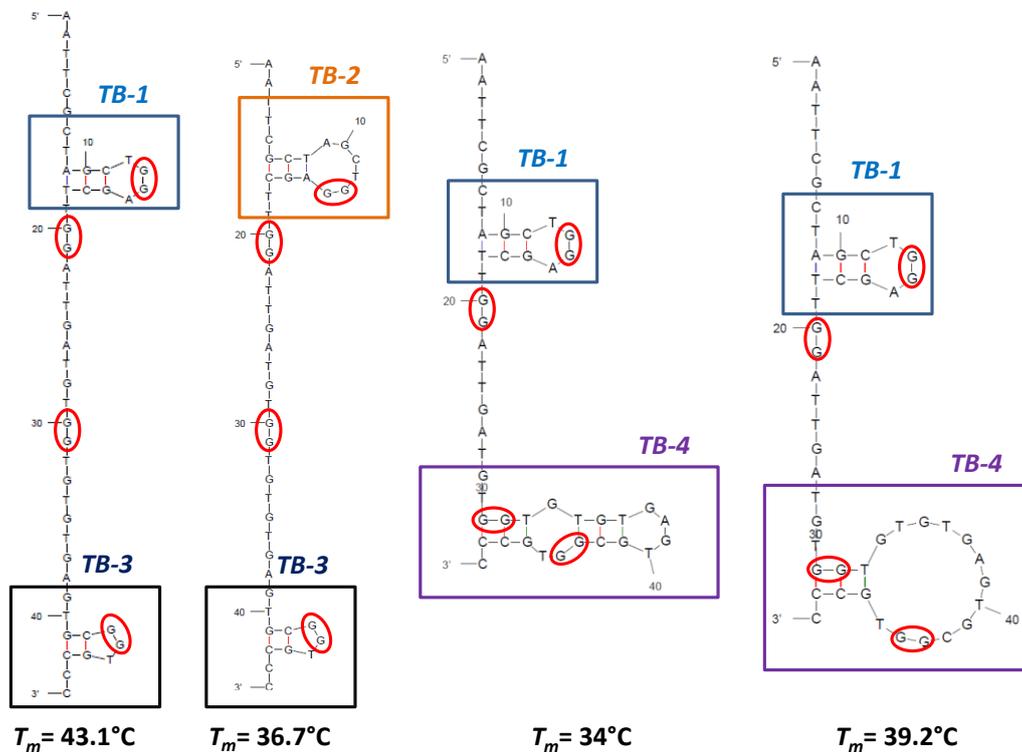


Fig 88 : **TB 1, 2, 3, 4** : structures en tige boucle, en rouge sont entourées les doublets de guanine susceptibles de structurer un G-quartet

Toutes ces *tiges-boucles* contiennent un doublet de guanine. Ces structures ne semblent donc pas compatibles avec la formation d'un quartet : étant donnée l'énergie thermique à apporter pour rompre ces structures, il paraît peu probable que la reconnaissance moléculaire de la cible puisse induire une reconfiguration en G-quartet.

- Etude de la séquence de reconnaissance

Les hypothèses de structuration ne peuvent prévoir qu'une ébauche de structure tertiaire. L'approche développée dans ce travail a d'abord été de muter l'aptamère pour essayer d'identifier les séquences indispensables à la reconnaissance, qu'elles soient structurantes ou impliquées directement dans la reconnaissance.

Pour se faire, l'hypothèse du G-quartet a été conservée, et les séquences de nucléotides entre les doublets ont été mutées par des séquences faites uniquement de thymine. Cette approche permet d'empêcher la formation des structures *TB 1, 2, 3* et *4* mais aussi d'évaluer le rôle des nucléotides 22 à 28 qui n'interviennent dans aucune structure secondaire (Fig 90).

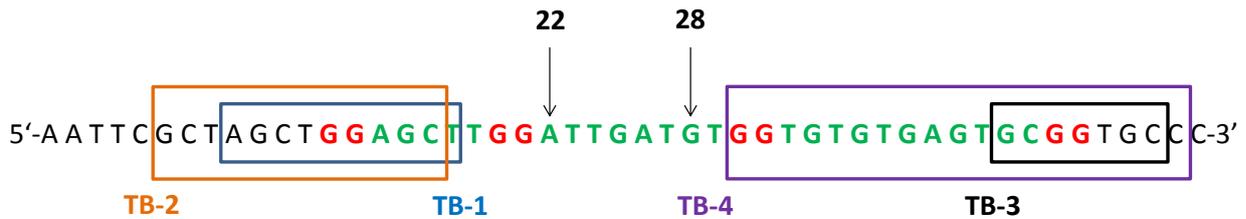


Fig 89 : Représentation schématique de la localisation des structures en *tige-boucle* simulées par *mfold*.  
En vert les séquences mutées

Un protocole d'évaluation de la reconnaissance entre les aptamères mutés et la cible par voltamétrie cyclique a alors été mis au point. Les séquences d'aptamères utilisées sont les suivantes (les mutations par rapport au brin initial (Wt = Wild type) sont identifiées en bleu, (M=Mutant) :

Wt : 5'-AATTCGCTAGCTGGAGCTTGGATTGATGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCCC-3'

M1 : 5'-AATTCGCTAGCTGGTTTTGGATTGATGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCCC-3'

M2 : 5'-AATTCGCTAGCTGGAGCTTGGTTTTTTGGTGTGTGAGTGCGGTGCCC-3'

M3 : 5'-AATTCGCTAGCTGGAGCTTGGATTGATGTGGTTTTTTTTGGTGCCC-3'

Les résultats expérimentaux  $i/i^{\circ} = f([D\text{-Apta}_{49}])$  sont représentés figure 90.

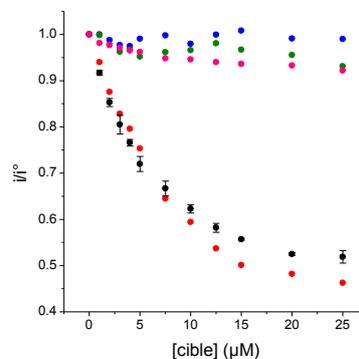


Fig 90 : Tests de reconnaissance de la L-Tym avec les aptamères mutés : Wt (wild type), M1, M2, M3, D-Aléa<sub>49</sub>

D'après ces résultats, seul l'aptamère M1 reconnaît encore la cible. Les nucléotides mutés dans M1 ne sont donc pas indispensables, contrairement à ceux de M2 et M3, dont les tests de reconnaissances sont voisins du D-Aléa<sub>49</sub> (aucune complexation).

Sur la base de cette conclusion, un aptamère tronqué de 17 nucléotides en 5' (soit un aptamère de 32 nucléotides) a été testé (5'-TTGGATTGATGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCCC-3'). Cette nouvelle séquence permet de tester la séquence non mutée de M1, et d'exclure expérimentalement l'hypothèse du G-quartet.

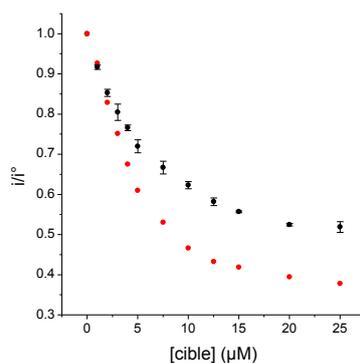


Fig 91 : Représentation graphique  $i/i^{\circ} = f([D\text{-apta}])$  pour des aptamères de 49 et 32 nucléotides.

Le test de reconnaissance de la *L*-Tym par voltammétrie cyclique montre alors que cette séquence raccourcie contient toujours les bases nécessaires à la reconnaissance (Fig 91). Cette troncature a même comme effet l'amélioration de l'affinité de l'aptamère pour sa cible, puisqu'un  $K_d^{32} = 1,8 \mu\text{M}$  a pu être déterminé ( $K_d^{49} = 2,8 \mu\text{M}$ ). L'hypothèse d'un quadruplexe est définitivement écartée par cette expérience.

Cette démarche par troncature de la séquence ayant été concluante, ce travail de réduction par l'extrémité 5' a été poursuivi. Sur la figure 92 sont représentés les résultats d'expérience de reconnaissance avec les aptamères de 28 et 23 nucléotides.

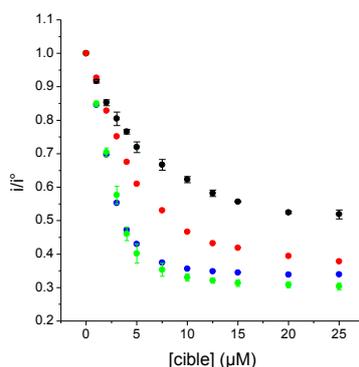


Fig 92 : Représentation graphique  $i/i^{\circ} = f([D\text{-apta}])$  pour des aptamères de 49, 32, 28 et 23 nucléotides.

Ces aptamères plus courts reconnaissent toujours la cible, et avec des affinités plus grandes : en effet pour une même concentration d'aptamère, les chutes de courant sont plus importantes avec la réduction en taille du brin, ce qui signifie qu'une plus grande quantité de *L*-Tym s'est complexées à l'aptamère. Au final, cette démarche a permis d'isoler une séquence minimale de 23 nucléotides de  $K_d^{23} = 0,8 \mu\text{M}$ .

En poursuivant la troncature côté 5', aucune séquence conservant son affinité n'a pu être isolée. Du côté 3', la simple perte de la première cytosine fait perdre les propriétés de reconnaissance.

Cette séquence de 23 bases (5'-TGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCCC-3') est faite de A à 4 %, de C à 17 %, de T à 31 % et de G à 48 %. Les simulations par *mfold* pour l'aptamère de 23 nucléotides sont rapportées figure 93.

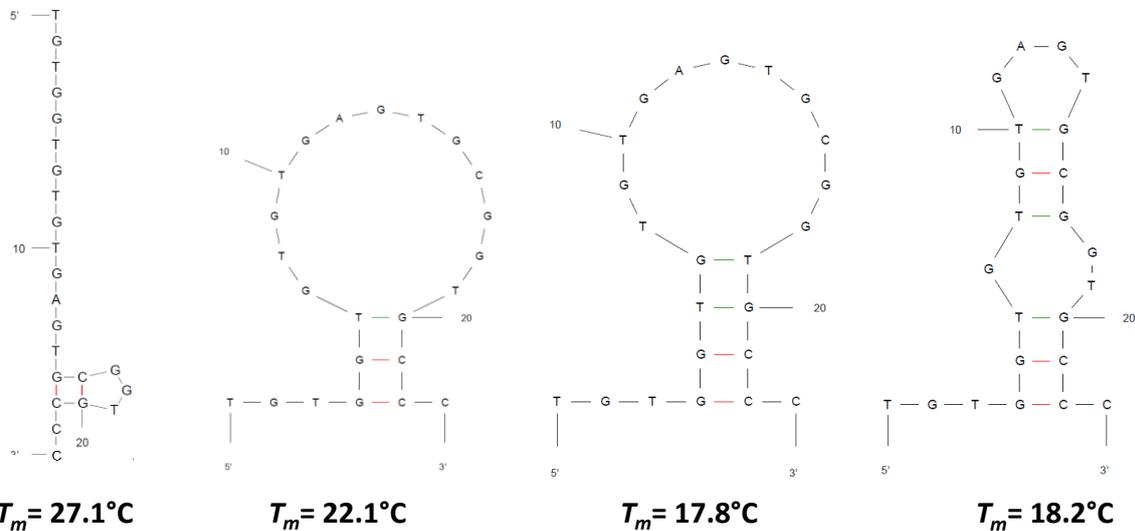


Fig 93 : Structures secondaires calculées par *mfold* pour l'aptamère de 23 nucléotides : en rouge les appariements de type *Watson-Crick*, en vert les appariement *Wobble*

Deux des structures proposées par *mfold* ont des températures de fusion en dessous de la température ambiante, et font apparaître des appariements de type *wobble*, moins stables que les *Watson-Crick*. Ces deux structures ne sont donc que très peu représentées en solution.

La même démarche que pour l'aptamère de 49 nucléotides a alors été appliquée : des brins mutés ont été testés afin de déterminer les bases strictement nécessaires à la reconnaissance.

Wt : 5'-TGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCCC-3'

M4 : 5'-TGTTTTGTGTGAGTGCGGTGCCC-3'

M5 : 5'-TGTGGTTTTTGTGAGTGCGGTGCCC-3'

M6 : 5'-TGTGGTGTGTTTTGCGGTGCC-3'

M7 : 5'-TGTGGTGTGTGAGTTTTTGCCC-3'

Pendant, aucune de ces séquences n'a conservée d'affinité pour la cible. Aucune conclusion sur la structure et la séquence du brin ne peut alors être déduite de ces expériences : chaque nucléotide semble jouer un rôle déterminant pour la reconnaissance.

Cette méthodologie a néanmoins permis d'isoler une séquence plus courte, avec une meilleure affinité, et qui sera désigné *D-Apta<sub>23</sub>*.

### c. Détermination des $K_d$ des brins réduits

Pour tenter de mieux comprendre les raisons du gain d'affinité, des brins de différentes longueurs (*D*-apta<sub>49</sub> raccourci par le côté 5' jusqu'à 23 nucléotides) ont dans un premier temps été étudiés par voltammétrie cyclique, et leur constante de dissociation vis-à-vis de la *L*-Tym déterminée (Fig 94).

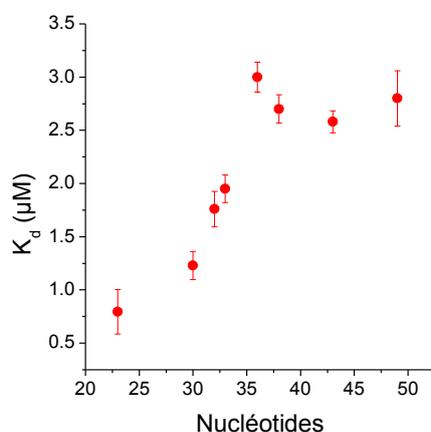


Fig 94 : Représentation graphique de  $K_d = f(\text{nucléotides})$

D'après la figure 94, plus le brin de départ *D*-Apta<sub>49</sub> est raccourci en 5', plus la valeur de  $K_d$  diminue, jusqu'à une valeur seuil de  $0,8 \pm 0,2$  µM pour le *D*-Apta<sub>23</sub>, soit environ 5 fois moins que pour le *D*-Apta<sub>49</sub>. Ces résultats suggèrent que la séquence du 1<sup>er</sup> au 19<sup>ème</sup> nucléotide gène la reconnaissance entre le ligand et son récepteur.

Cependant, ces résultats n'indiquent pas si cette gène dépend de la séquence nucléotidique ou de la simple présence de nucléotides supplémentaires. Pour répondre à cette question, des aptamères *D*-Apta<sub>23</sub> allongés en 5' de 6, 16 ou 26 adénines en 5' ont été étudiés (Fig 95).

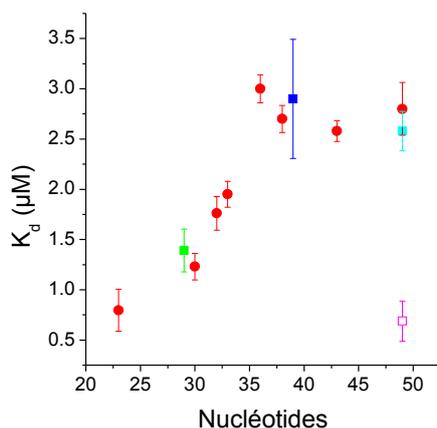


Fig 95 :  $K_d = f(\text{nucléotides})$ . En **ronds rouges** les  $K_d$  mesurés pour le *D*-Apta<sub>49</sub> raccourci, en **carré plein** les  $K_d$  du *D*-Apta<sub>23</sub> allongé de 6, 16 et 26 adénosines en 5'. En **carré rose vide**, le  $K_d$  du *D*-Apta<sub>23</sub> allongé de 26 adénosines du côté 3'.

D'après la figure 95, la variation de la constante de dissociation est indépendante de la séquence en 5' au-delà des 23 nucléotides nécessaires à la reconnaissance. De plus, la variation du  $K_d$  avec la taille de l'aptamère est orientée puisque l'allongement de l'aptamère *D*-Apta<sub>23</sub> du côté 3' ne change pas la valeur de ce paramètre (carré rose sur la figure 95).

### a. Détermination des $k_{on}$ des brins réduits

La diminution de  $K_d$  avec la taille du brin peut s'expliquer par une modification des constantes cinétiques ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ) de la reconnaissance. La détermination des paramètres cinétiques a alors été entreprise via la technique électrochimique sur goutte tournante.

La figure 96.a représente l'évolution des  $K_d$  mesurés par cette technique. L'amplitude de variation est dans ce cas de 0,7 à 5,8  $\mu\text{M}$ , soit un facteur 7 entre le  $D\text{-Apta}_{49}$  et le  $D\text{-Apta}_{23}$ , ce qui est similaire aux résultats précédemment obtenus par voltammétrie cyclique dans des conditions non hydrodynamiques.

La figure 96.b représente les cinétiques obtenues après injection de 5  $\mu\text{l}$  de 25  $\mu\text{M}$  d'aptamères de 49, 33, 31, 28 et 23 nucléotides à une solution de 5  $\mu\text{M}$  de médiateur et 5  $\mu\text{M}$  de  $L\text{-Tym}$ .

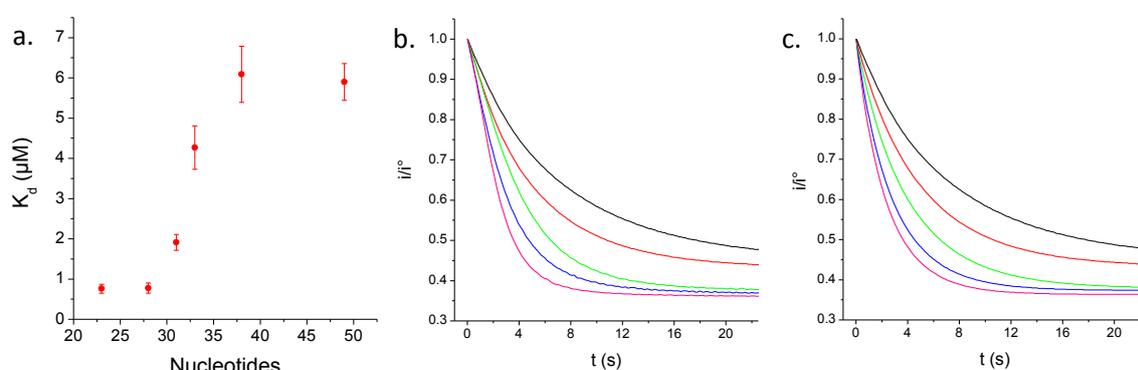


Fig 96: a. Détermination des  $K_d$  par EDT

b. Chronoampérogrammes obtenus après injection de 5  $\mu\text{M}$  de  $L\text{-Tym}$  dans 5  $\mu\text{M}$  de complexe d'osmium (II), puis de 25  $\mu\text{M}$  de  $D\text{-Apta}$  de 49, 33, 31, 28 et 23,  $E = 0,7 \text{ V vs Ag/AgCl}$ , température ambiante.

c. Simulation des chronoampérogrammes

D'après ces courbes, il apparait clairement que plus l'aptamère est court, plus l'équilibre est atteint rapidement. Une simulation de ces cinétiques a été réalisée à partir des valeurs de  $K_d$  et des valeurs de  $i_p^\infty/i_p^0$  déterminées expérimentalement pour chaque brin et en ajustant la valeur de  $k_{on}$  entre 18000 et 5000  $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (Fig 97.c).

L'évolution de  $k_{on}$  et  $k_{off}$  (déduite à partir du  $K_d$ ) en fonction de la longueur du brin est représentée figure 97.

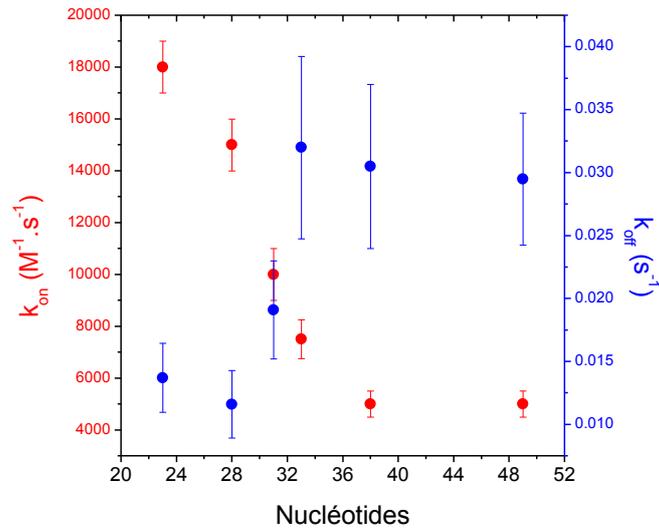


Fig 97: Evolution du  $k_{on}$  et du  $k_{off}$  en fonction de la taille de l'aptamère.

D'après ces résultats, il semblerait qu'une extension du *D*-Apta<sub>23</sub> par des nucléotides affecte la formation du complexe non seulement lors de la cinétique de formation mais aussi lors de la dissociation.

### b. Discussion

Il existe deux grands modèles de mécanisme pour décrire les phénomènes d'association entre un simple brin d'ADN et une molécule de faible poids moléculaire : la recherche de conformation et le processus de reconnaissance induite (Fig 98).

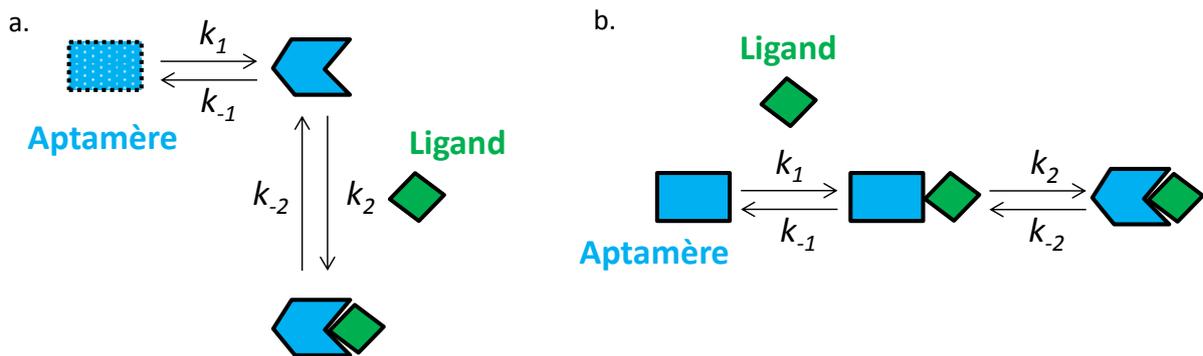


Fig 98: a. Illustration du mécanisme de recherche de conformation pour lequel l'aptamère coexiste sous différentes structures tridimensionnelles et dont une présente un site de fixation complémentaire de son ligand ;  
 b. Illustration du mécanisme de processus de reconnaissance induite où l'aptamère non structuré forme un complexe précurseur au contact de la cible avant de se lier plus fortement.

### i. Recherche de conformation

Dans ce modèle, l'hypothèse est faite que l'aptamère coexiste sous différentes structures métastables. Ainsi une solution d'aptamère doit être vue comme une population de conformations rendues possibles grâce à des interactions variées entre les éléments constitutifs de la séquence (cf chapitre I). Or ces structures sont stabilisées par la présence d'ions, et notamment  $Mg^{2+}$  qui joue un rôle structurant. Toutefois, en augmentant la concentration en  $Mg^{2+}$ , certaines structures peuvent alors être favorisées, sans que ce ne soit forcément la conformation la plus favorable à la reconnaissance de la cible (conduisant alors à des pièges cinétiques<sup>213</sup>). Ainsi, un mécanisme de recherche de conformation se traduit par une augmentation de l'affinité avec la concentration en  $Mg^{2+}$  jusqu'à une valeur seuil à partir de laquelle l'affinité décline. La mise en évidence expérimentale d'un tel comportement indiquerait un processus de reconnaissance par recherche de conformation.

Des expériences de reconnaissance entre les aptamères anti-*L*-Tym de 49 et 23 nucléotides ont alors été réalisées pour différentes concentrations en  $Mg^{2+}$ , et les  $K_d$  et  $k_{on}$  déterminés (Fig 99).

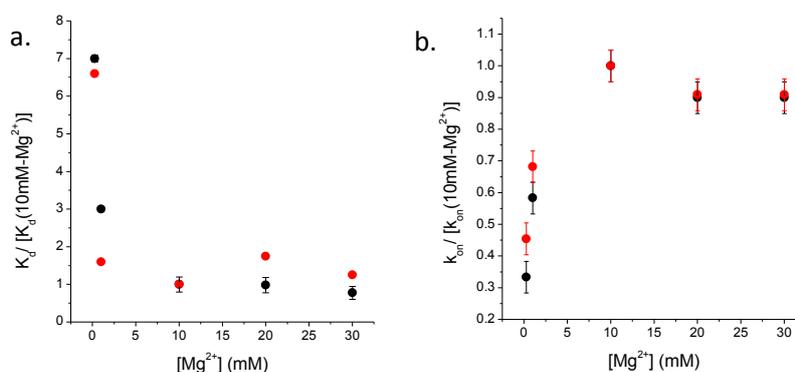


Fig 99 : a. Variations du a.  $K_d$  et b.  $k_{on}$  normalisées par rapport au  $K_d$  et  $k_{on}$  déterminés dans les conditions optimales de reconnaissance (*i.e.* 10 mM de  $MgCl_2$ ) en fonction de la concentration en  $Mg^{2+}$  pour ***D-Apta*<sub>49</sub>** et ***D-Apta*<sub>23</sub>**.  
[ $Mg^{2+}$ ] = 0,25, 1, 10, 20 et 30 mM, Tris 5 mM, pH 7,4, force ionique constante (140 mM de charges)

D'après les résultats de la figure 99, le magnésium joue un rôle majeur dans la reconnaissance puisque pour 250  $\mu$ M, l'affinité de l'aptamère pour sa cible (quelque soit la longueur) est 7 fois moins bonne que pour des concentrations en magnésium supérieur à 10 mM. Au-delà de 10 mM de  $Mg^{2+}$  en solution, ni l'affinité, ni la vitesse de complexation ne sont affectées par un excès de magnésium. Le modèle de recherche de conformation semble ainsi inapproprié.

Par ailleurs, une autre remarque peut appuyer cette conclusion. Les résultats obtenus figure 95 montrent que le  $K_d$  est indépendant de la séquence en 5' au-delà des 23 nucléotides strictement requis pour la reconnaissance. De plus, des expériences de mesure du  $k_{on}$  pour un brin *D-Apta*<sub>23</sub> allongé en 5' par 26 adénosines montrent que ce brin se comporte cinétiquement comme le brin *D-Apta*<sub>49</sub>. Il semblerait alors, dans le cadre du modèle de recherche de conformation, que les populations d'aptamères entre le *D-Apta*<sub>49</sub> et le *D-Apta*<sub>23</sub>-PolyA soient les mêmes, et donc que ces populations soient indépendantes de la séquence en 5'. Or, plus une séquence est courte, plus la diversité de population est restreinte et les reconfigurations structurales rapides. De ce fait, il semble

peu probable d'estimer une *Recherche de Conformation* cinétiquement limitante dans le cas de la *L*-Tyrosinamide.

## ii. Processus de reconnaissance induite

Dans ce modèle, l'aptamère modifie sa conformation après qu'une reconnaissance faiblement affine a eu lieu. L'étape cinétiquement limitante de la formation du complexe est alors une reconfiguration plus stable autour de la cible.

Les résultats obtenus figure 95 montrent que le gain d'affinité avec la réduction de la séquence en 5' est indépendante de la séquence, et que lorsque 26 adénines sont introduites en 3' de l'aptamère, ce brin conserve un  $K_d$  voisin du *D*-Apta<sub>23</sub>. L'affinité n'étant pas dépendante du nombre total de nucléotides mais uniquement de la présence de nucléotides en 5', il est très probable qu'une gêne stérique soit à l'origine de la différence d'affinité entre les différentes séquences. Cette observation est compatible avec un processus de reconnaissance induite, dont la dynamique peut être attribuée à l'extrémité 5' de l'aptamère.

Cette gêne aurait alors un impact entropique défavorable dans le processus de reconnaissance. Un moyen de vérifier cette hypothèse serait de faire des mesures d'affinité par ITC avec le brin de 23 nucléotides.

La méthodologie de détermination des paramètres cinétiques d'une reconnaissance aptamère/cible par électrochimie ne permet cependant pas d'avoir accès directement aux constantes cinétiques  $k_2$  et  $k_{-2}$  du modèle de processus de reconnaissance induite. En effet, les complexes précurseurs et complexes aptamère/cible ont des coefficients de diffusion identiques.

D'après ces hypothèses, la reconfiguration induite de l'aptamère autour de sa cible est orientée du côté 5'. Cet élément d'information est primordial pour le développement d'un aptacapteur où l'aptamère serait greffé sur une surface. En effet l'immobilisation de la séquence de 23 nucléotides par le côté 5' ou 3' doit entraîner des réponses différentes, en raison des contraintes différentes dans les degrés de liberté entre le côté greffé et le côté libre.

Il a donc été entrepris des expériences de reconnaissance hétérogène de la *L*-Tym par le *D*-Apta<sub>23</sub> immobilisé sur une surface par microbalance à quartz.

## IV-2- Microbalance à quartz électrochimique avec dissipation (eQCM-D)

*Une description du fonctionnement de la microbalance à quartz électrochimique avec dissipation est présentée en Annexe V p141.*

### a. Considération expérimentale

Dans la configuration d'aptacapteur envisagée, les aptamères doivent être greffés sur la surface du quartz recouvert d'or. Pour cela, la stratégie retenue est l'utilisation d'aptamères fonctionnalisés par un thiol en 5' ou en 3'. Une fois les aptamères greffés en surface (cf matériels et méthodes p 113), la

concentration surfacique ( $\Gamma_{\text{apta}}$ ) nécessite d'être déterminée afin de pouvoir interpréter quantitativement l'affinité des brins immobilisés à partir des variations de fréquences. Pour ce faire, l'aptamère de 23 nucléotides a été modifié à une extrémité par un thiol et à l'autre par un ferrocène (Fig 100). L'électroactivité du ferrocène permet alors de déterminer  $\Gamma_{\text{apta}}$ .



Fig 100 : Aptamère anti-L-Tym utilisé pour la fonctionnalisation des quartzs.

Ces brins ont été chimisorbés sur or après réduction du pont disulfure par du tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) pendant une heure à température ambiante et à l'obscurité. Cette réaction a pour conséquence de cliver la molécule en une molécule d'aptamère 5'-Fc-D-Apta<sub>23</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-SH-3' et une molécule HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SH. En présence d'une surface d'or, il y aura donc un codépôt de ces molécules.

Après la fonctionnalisation par les aptamères, la surface d'or non recouverte est comblée grâce à une molécule diluante, le mercaptohexanol (MCH, 1mM dans 1M de NaClO<sub>4</sub>), largement utilisée dans le développement des aptacapteurs électrochimiques<sup>140-142</sup>. La présence de MCH limitera les interactions non-spécifiques entre l'ADN et l'or.

#### b. Détermination de la concentration surfacique en aptamère

L'injection d'aptamère dans la chambre de réaction du module de Microbalance à Quartz électrochimique avec Dissipation (e-QCMD) provoque une forte variation de fréquence ( $\Delta f = -35$  Hz) signifiant que l'aptamère s'est déposé à la surface du quartz (Fig 101). La variation de la dissipation ( $\Delta D = +1,1$ ) est due au caractère viscoélastique de la couche d'ADN greffée. Le rinçage entraîne une forte variation de la dissipation ( $\Delta D = +0,8$ ) et une légère augmentation de la masse ( $\Delta f = -2$  Hz), ce qui pourrait indiquer une modification d'hydratation de la couche. A cette étape de la fonctionnalisation, la détection du ferrocène en 5' peut se faire par voltammétrie cyclique, et  $\Gamma_{\text{apta}}$  est déterminée à partir de l'intégration des pics d'oxydation et de réduction.

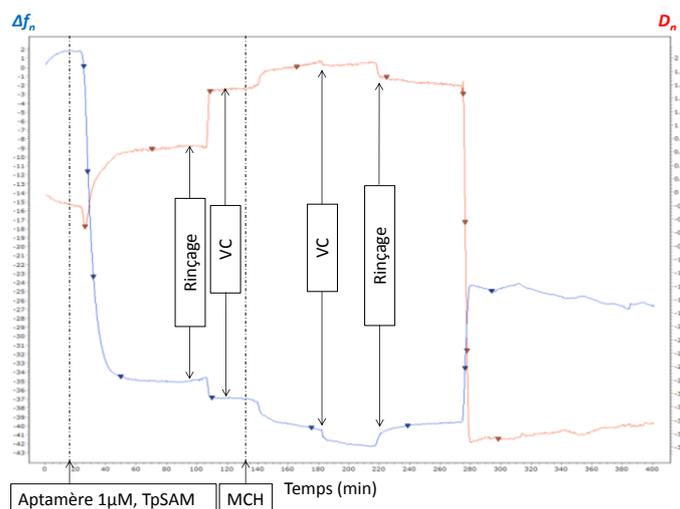


Fig 101 : Variation de fréquence  $\Delta f$  et de dissipation  $\Delta D$  au cours d'une fonctionnalisation d'un quartz par l'aptamère Fc - 5'- Apta<sub>23</sub>- 3'- SS -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- O - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>- OH préalablement réduit par TCEP, à température ambiante.  
VC : Voltammétrie Cyclique

La fonctionnalisation par le MCH provoque une légère variation de fréquence ( $\Delta f = -2$  Hz) et de dissipation ( $\Delta D = +1,1$ ). La caractérisation électrochimique montre un courant capacitif plus faible après l'introduction de MCH. L'intégration des pics du ferrocène est similaire avant et après ce dépôt (fig 102).

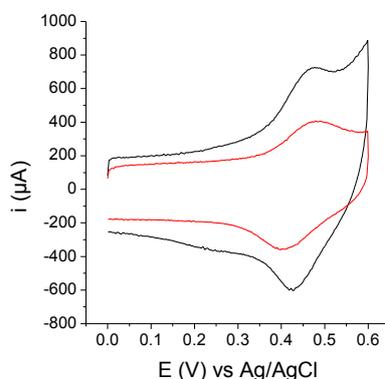


Fig 102 : voltammogrammes réalisés **avant** et **après** le dépôt de MCH  
 $v = 20 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$  vs Ag/AgCl, température ambiante.

Quantitativement, l'intégration des pics d'oxydation et de réduction pour deux expériences indique que 5,5 et 6,5 pmol/cm<sup>2</sup> d'aptamère ont été greffées à la surface du quartz. Ces valeurs sont en bon accord avec la littérature<sup>138,141,142</sup>.

### c. Détermination des $K_d$ pour différentes stratégies de greffage

Quatre configurations d'aptamère ont été testées dans ce travail (Fig 103) : le greffage en 5' ou en 3' mais également des séquences allongées de 6 thymines pour éloigner la séquence de la surface. Cette dernière configuration permet d'éviter deux gênes éventuelles :

- celle provoquée par la proximité du MCH avec la cytosine terminale en 3' indispensable à la reconnaissance ;

- celle induite par une trop grande proximité de la surface : un repliement trop conséquent du côté 5' vers l'extrémité 3' sera dans ce cas peu probable.

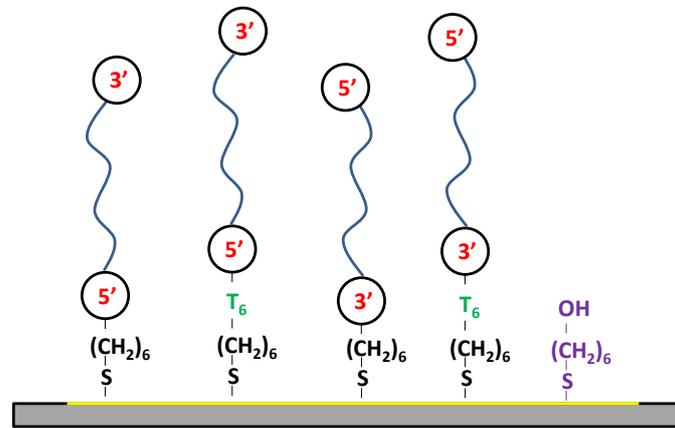


Fig 103 : Représentation des différentes stratégies de greffage : T<sub>6</sub> = chaîne nucléotidique de 6 thymines, en violet le MCH.

#### i. Greffage du côté 3'

Dans cette expérience, deux quartz ont été fonctionnalisés en parallèle par un aptamère avec ou sans les 6 thymines (Fig 103). Le protocole de détermination des  $K_d$  consiste à introduire une concentration donnée de *L-Tym* puis à faire circuler le tampon sans cible pour régénérer la surface.

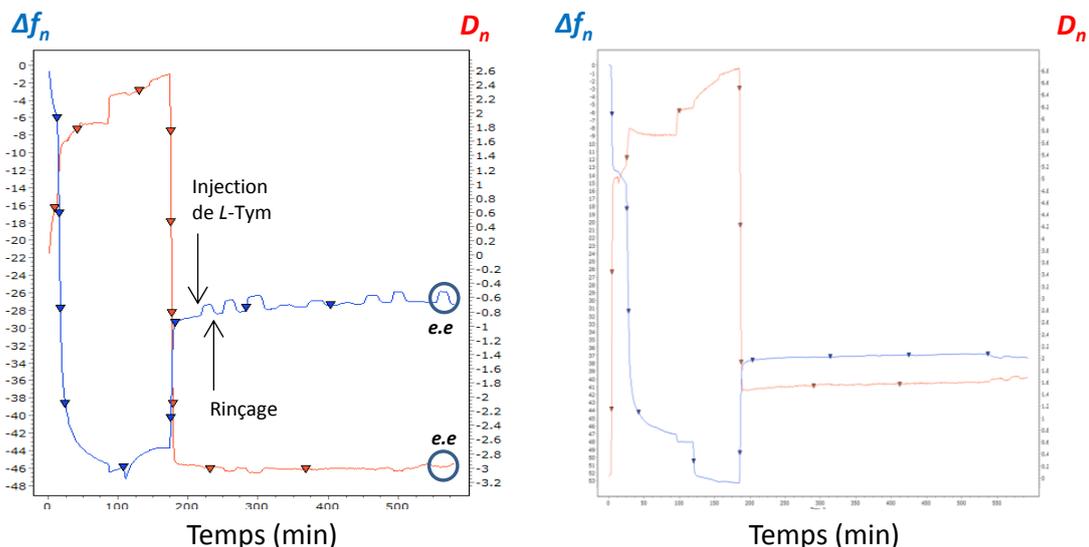


Fig 104 : Variations de fréquence et de dissipation pour un quartz fonctionnalisé par  
a. 5'-Apta<sub>23</sub>-C<sub>6</sub>-T<sub>6</sub>-SH-3' et b. 5'-Apta<sub>23</sub>-C<sub>6</sub>-SH-3'.

Pour l'aptamère allongé de 6 thymines, l'ajout de concentrations croissantes de *L-Tym* (de 0,5 à 100  $\mu$ M) provoque une augmentation de  $\Delta f$  (perte de masse) et une diminution de  $D$  (diminution de la

viscoélasticité et/ou de la hauteur de la couche). Cette variation est réversible avec le rinçage. En présence de *D*-Tym à 2 mM ( $t = 520$  min), aucune variation de  $\Delta f$  ou de  $D$  n'est enregistrée, montrant ainsi l'énantiosélectivité de la reconnaissance. De plus, 20  $\mu\text{M}$  de *L*-Tym dans 2mM de *D*-Tym entraîne une réponse en fréquence comme en dissipation, ce qui montre bien la capacité de l'aptamère à détecter des *e.e* (Fig 104.a).

Aucune variation de  $\Delta f$  et de  $\Delta D$  n'est enregistrée dans le cas de l'aptamère greffé sans les 6 thymines (Fig 104.b). Cela prouve que les variations observées figure 104.a sont bien spécifiques à la configuration de greffage.

L'analyse de ces variations de fréquence en utilisant le modèle de Sauerbrey permet de tracer  $\Delta m = f([L\text{-Tym}])$ . Grâce à une isotherme de Langmuir (Fig 105), un  $K_d^{app}$  d'environ 5  $\mu\text{M}$  peut être évalué, en admettant une variation maximale de masse de 30 ng.

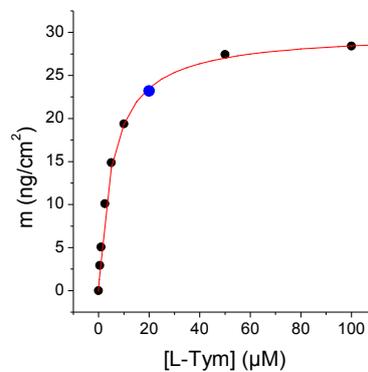


Fig 105 : Perte de masse enregistrée en fonction de la concentration de *L*-Tym.

Le point **bleu** est une mesure d'excès énantiomérique à 1 % (20  $\mu\text{M}$  de *L*-Tym dans 2 mM de *D*-Tym).

Ici, la constante de dissociation que nous définissons est dite « apparente » car le phénomène de reconnaissance est analysé indirectement, via la perte d'eau engendrée par la reconfiguration de l'aptamère lors de la complexation de la cible.

## ii. Greffage du côté 5'

La même expérience a été faite avec le couple d'aptamère avec et sans les 6 thymines mais cette fois avec la fonction thiol du côté 5' de l'aptamère (Fig 106).

Dans ce cas, le brin sans les thymines ne montre toujours pas de signe de reconnaissance de la cible, tandis que le brin avec les 6 thymines interagit spécifiquement avec la *L*-Tym. En effet les variations de fréquence et de dissipation sont réversibles après rinçage. De la même manière que son homologue greffé en 3', ce brin conserve une énantiométrie (pas de réponse à la présence de *D*-Tym) et une capacité de reconnaissance de la *L*-Tym à 1 % dans une matrice de *D*-Tym.

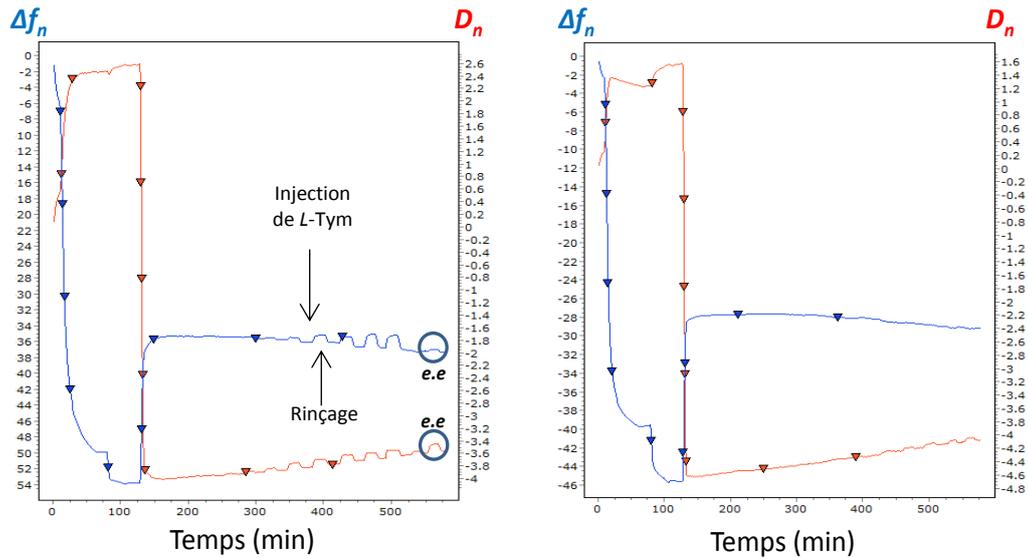


Fig 106 : Variations de fréquences et de dissipation pour un quartz fonctionnalisé par a. 5'- HS - C<sub>6</sub>- T<sub>6</sub>- Apta23-3', et b. 5'- HS - C<sub>6</sub>- Apta23 - 3'.

L'analyse des variations de masse calculées par l'application de la relation de Sauerbrey à partir de variations de fréquence nous permet de déterminer un  $K_d^{app}$  d'environ 80  $\mu\text{M}$  et une variation maximale de masse de 34,28  $\text{ng}/\text{cm}^2$  (Fig 107).

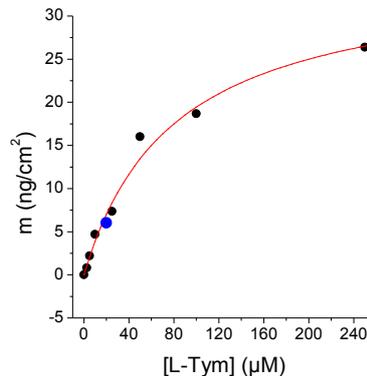


Fig 107 : Perte de masse enregistrée en fonction de la concentration de L-Tym.  
Le point **bleu** est une mesure d'excès énantiomérique à 1 % (20 $\mu\text{M}$  de L-Tym dans 2mM de D-Tym).

Outre cette différence de  $K_d$  (80  $\mu\text{M}$  vs 5  $\mu\text{M}$ ) pour les 2 types de greffage (3' et 5') des séquences contenant 6 thymines, la variation de dissipation en présence de L-Tym évolue dans des sens opposés : elle diminue dans le cas du greffage en 3' et elle augmente dans le cas du greffage en 5'. Ce comportement reproductible demeure inexpliqué à ce jour.

### IV-3- Conclusion

Ce chapitre exploratoire a permis d'optimiser la séquence d'aptamère en la réduisant à 23 nucléotides, en ne faisant que des hypothèses sur la structuration de la séquence en solution. Cette séquence s'est avérée plus affine pour sa cible, et en utilisant des brins de 23 nucléotides allongés en 5' ou en 3' par des séquences de tailles variables de poly-adenosine, nous avons pu mettre en

évidence un effet stérique expliquant la différence d'affinité entre des séquences de 23 et 49 nucléotides. La dynamique de reconnaissance orientée vers le côté 5' a pu être confirmée par une étude en configuration d'aptacapteur, montrant alors la complémentarité des études en homogène avant celles en configuration hétérogène.

## Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse montre pour la première fois que l'électrochimie en condition homogène peut être utilisée à des fins analytiques pour caractériser l'affinité d'un récepteur pour sa cible (électroactive ou non), en discriminant les ligands libres et liés par leurs coefficients de diffusion. L'électrochimie apparaît alors comme un outil pratique, performant et compétitif pour l'étude d'interactions aptamère/cible. D'une part parce que la méthodologie de détermination de la constante de dissociation est simple et rapide à mettre en œuvre avec une sensibilité telle qu'il est possible de déterminer un excès énantiomérique de 0,1 %, et d'autre part parce que la méthodologie de détermination des paramètres cinétiques de reconnaissance permet d'explorer les mécanismes moléculaires de complexation récepteur/cible. Ces performances n'auraient cependant pas pu être atteintes sans les propriétés remarquables des aptamères, à savoir leur affinité, sélectivité et énantiosélectivité.

En alliant à la fois l'analyse quantitative (détermination de  $K_d$ , d'*e.e.*, de  $k_{on}$  et  $k_{off}$ ) et qualitative (par l'intermédiaire d'analogues structuraux, de sondes et de brins mutés/tronqués) ces méthodologies pourraient trouver leur place dans les services de chimie analytique comme dans les laboratoires de recherche fondamentale. En effet, dans le premier cas, l'adaptation de ces techniques pour des analyses (bio)chimiques concrètes (pour le secteur médical ou environnemental) pourrait d'ores et déjà être envisagée. Dans le second cas, ces méthodologies pourraient contribuer à la compréhension des phénomènes de reconnaissance bimoléculaire impliquant des aptamères, notamment en combinant ces méthodes avec une technique d'analyse structurale des acides nucléiques comme le dichroïsme circulaire ou la RMN.

Ces techniques explorées ici peuvent encore être optimisées et adaptées à d'autres systèmes. A propos de la technique de détermination des constantes thermodynamiques de complexation, une stratégie consistant à immobiliser des aptamères sur des objets de taille micrométrique permettrait de distinguer les formes libres et liées des cibles avec une plus grande amplitude (plus grande variation de coefficient de diffusion) tout en permettant des analyses avec des récepteurs de moins bonne affinité (gamme de concentration en aptamère utilisable plus large). Cette stratégie pourrait également être utilisée pour la détection de plusieurs analytes simultanés (multiplexage).

Dans le cas de la méthodologie de détermination des paramètres cinétiques de complexation, des analyses à température contrôlée permettraient de déterminer les variations enthalpiques et entropiques de n'importe quel complexe aptamère/cible. Ce dispositif peut également être utilisé pour l'étude de mécanismes enzymatiques en condition homogène.

# **Matériels et Méthodes**

## Titration des Aptamères

Les aptamères en série (*D*) et (*L*) ont été synthétisés et purifiés par RP-HPLC par Eurogentec (Angers, France). Ces aptamères sont reçus sous forme lyophilisée dans un tube type Eppendorf. Après avoir été solubilisés, leurs concentrations sont systématiquement mesurées par spectroscopie UV-Visible avec un NanoDrop 2000 (Thermofisher).

A la réception, Eurogentec fournit une fiche technique détaillée précisant la quantité de matière envoyée après la purification. Dans ce travail, les aptamères étaient resuspendus à 1,25mM.

A partir de cet échantillon mère, plusieurs solutions de 0,5 à 5  $\mu\text{M}$  sont préparées et leurs absorbances mesurées à 260 nm. La figure M1 présente un exemple de variation de la densité optique en fonction de la concentration théorique en aptamère. Ces résultats peuvent être ajustés par une droite.

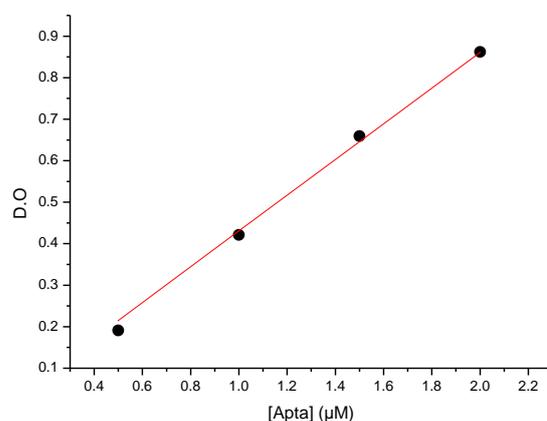


Fig M1 :  $D.O = f([D\text{-Apta}_{49}])$  pour un aptamère de 49 nucléotides.

$$\text{Pente} = 430533 \text{ M}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}, R^2 = 0.9966$$

D'après la loi de Beer Lambert :

$$DO = \varepsilon \cdot l \cdot C_i$$

Où  $\varepsilon$  est le coefficient d'extinction molaire en  $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $l$  est le trajet optique en cm et  $C_i$  la concentration en espèce  $i$ . Pour un trajet optique de 1 cm, l'ajustement linéaire des résultats expérimentaux permet d'obtenir une valeur expérimentale  $\varepsilon$ , pente de la régression linéaire. Dans l'exemple présenté figure M1, la pente est de  $430533 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  pour une valeur théorique de  $463600 \text{ M}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , soit 93 % de la valeur théorique. La concentration de la solution mère n'est donc pas de 1,25 mM mais 1,16 mM.

## Electrodes sérigraphiées

Une sérigraphieuse semi-automatique DEK modèle 65 (Presco, USA) a été utilisée pour déposer successivement de fines couches d'encre sur des films plans de téréphthalate de polyéthylène à travers des grilles d'acier inoxydable (230 fils d'acier inoxydable par pouce carré). Ce dispositif permet de sérigraphier 20 électrodes en même temps. L'électrode de travail et la contre électrode sont préparées à partir d'une encre Electrodrag PF-407A (Acheson Colloids Co), tandis que la pseudo électrode de référence est préparée à partir d'encre d'argent Electrodrag 418S (Acheson Colloids Co).

Une première couche d'argent est déposée pour former le contact électrique puis séchée dans un four 15 minutes à 120°C. Puis la couche de carbone permettant de former l'électrode de travail et la contre électrode est appliquée et séchée 15 minutes à 120°C. Enfin, une couche diélectrique hydrophobe (Vinilfast 36, Kiian, Italie) est appliquée et séchée dans les mêmes conditions afin d'isoler chaque cellule électrochimique de 5 mm de diamètre, ce qui permet à un volume de 50  $\mu\text{l}$  de solution d'être maintenue à la surface des électrodes sans s'étaler.

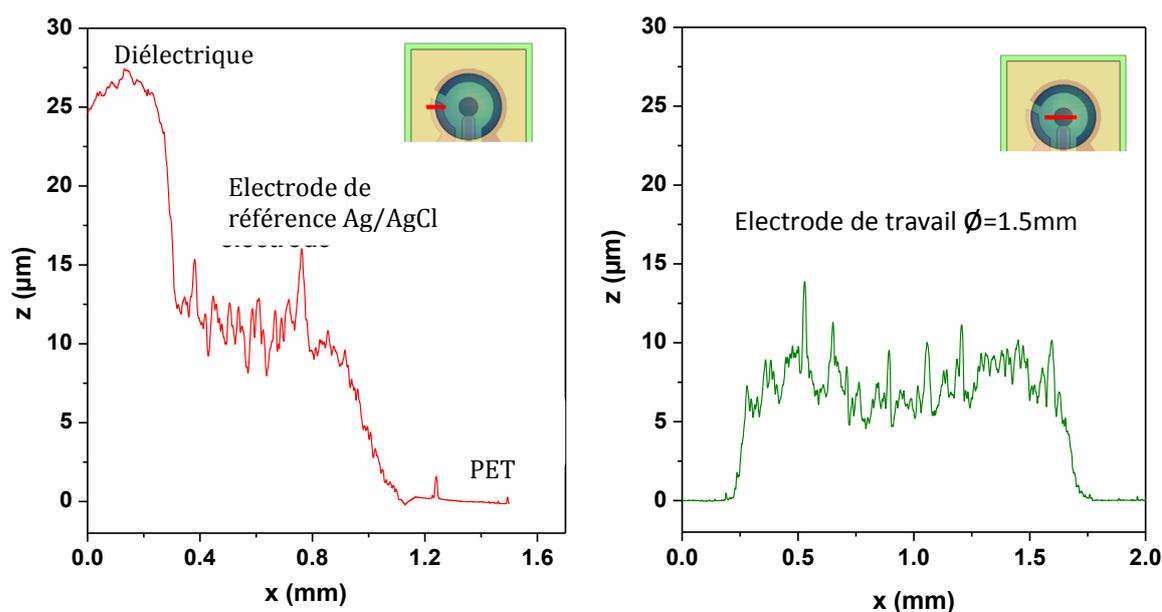


Fig M2 : Profil transversal des électrodes le long d'une coupe indiquée en rouge. A gauche, à proximité du bord de la cellule électrochimique, à droite la coupe est réalisée à travers l'électrode de travail.

L'épaisseur des couches a été déterminée grâce à un profilomètre (modèle Alpha-Step 500, KLA-Tencor, USA, Fig M2). L'épaisseur de la couche d'argent est de  $10 \pm 0,5 \mu\text{m}$  et celle de carbone de  $6 \pm 0,5 \mu\text{m}$ . La couche d'isolant quant à elle est de  $15 \pm 0,5 \mu\text{m}$ .

## Protocole expérimental de détermination des constantes thermodynamiques

Toutes les procédures électrochimiques ont été réalisées avec un AUTOLAB PGSTAT 12 potentiostat/galvanostat contrôlé par ordinateur. Les données étaient acquises par le logiciel GPES 4.9007 (EcoChemie, Pays Bas).

Afin de déterminer le  $K_d$  d'un aptamère pour la *L-Tym* le protocole suivant a été appliqué :

- Cycler 10 fois l'électrode sérigraphiée entre 0 et 1,2 V vs Ag/AgCl à  $500 \text{ mV.s}^{-1}$  ;
- Déposer 50  $\mu\text{l}$  de solution de BSA (Bovin Serum Albumine) à 1 g/L pendant 10 min. Cette étape a pour but de limiter l'adsorption de l'osmium et de la *L-Tym* à la surface de l'électrode ;
- Rincer l'électrode 3 fois avec 50  $\mu\text{l}$  de tampon Tris pH 7,4,  $[\text{NaCl}] = 50 \text{ mM}$ ,  $[\text{MgCl}_2] = 10 \text{ mM}$  ;
- Cycler 10 fois l'électrode sérigraphiée entre 0 et 0,8 V vs Ag/AgCl à  $500 \text{ mV.s}^{-1}$  en tampon ;
- Changer la goutte de 50  $\mu\text{l}$  ;
- Placer le système dans une enceinte humide pour limiter l'évaporation de la goutte ;
- Introduire le complexe d'osmium en ajoutant 0,2  $\mu\text{l}$  d'une solution à 250  $\mu\text{M}$  ( $C_{os} = 1 \mu\text{M}$ ) ;
- Cycler 10 fois l'électrode sérigraphiée entre 0 et 0,8 V vs Ag/AgCl à  $500 \text{ mV.s}^{-1}$  ;
- Introduire 5  $\mu\text{M}$  de *L-Tym* en ajoutant 0,2  $\mu\text{l}$  d'une solution à 1,25 mM ( $C_T^0 = 5 \mu\text{M}$ ) ;
- Cycler l'électrode **une seule fois** à  $50 \text{ mV.s}^{-1}$  entre 0,3 et 0,75 V vs Ag/AgCl puis **agiter vivement la goutte à la pipette**. Recommencer jusqu'à ce que l'oxydation catalytique de la *L-Tym* soit stable (typiquement 5 à 7 fois) ;
- Introduire 0,2  $\mu\text{l}$  de solutions d'aptamère :
  - à 250  $\mu\text{M}$  pour incrémenter la concentration en aptamère de 1  $\mu\text{M}$  ;
  - à 625  $\mu\text{M}$  pour incrémenter la concentration en aptamère de 2,5  $\mu\text{M}$  ;
  - à 1250  $\mu\text{M}$  pour incrémenter la concentration en aptamère de 5  $\mu\text{M}$  ;

Les points de gamme réalisés sont 0 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 12,5 ; 15 ; 20 et 25  $\mu\text{M}$  en aptamère.

Après chaque addition, 3 voltammogrammes de la solution sont réalisés et enregistrés, en **agitant vivement la solution entre chaque cycle**. Le pic d'oxydation du dernier voltammogramme est retenu comme valeur expérimentale.

- A la fin de l'expérience, s'assurer que le volume de la goutte est toujours de 50  $\mu\text{l}$ .
- Pour la représentation graphique  $i/i^\circ = f([D\text{-Apta}_x])$ ,  $i^\circ$  est recalculé en fonction de la dilution.
- Chaque détermination de  $K_d$  est réalisée à partir d'au moins trois expériences, avec trois électrodes différentes et différents lots d'aptamères. Ainsi, des barres d'erreur < 5 % sont calculées.