

Ce chapitre a pour objectif d'apporter un certain nombre d'informations générales sur les systèmes étudiés afin de contextualiser les différents développements de ce travail de thèse et de justifier les choix adoptés. Ainsi, la première partie de ce chapitre retrace brièvement les contours du concept de chiralité pour illustrer son importance dans l'activité biologique et souligner l'intérêt majeur du développement de systèmes capable de doser des excès énantiomériques. La deuxième partie présente les différents types de récepteurs énantiosélectifs intégrés dans les dispositifs analytiques actuels. Enfin, les parties 3 et 4 de ce chapitre ont respectivement pour objectifs de justifier le choix des aptamères comme récepteur énantiosélectif et de réaliser un état de l'art sur leurs utilisations en chimie analytique.

La chiralité

a. Définition

Par définition, la chiralité désigne l'asymétrie qui peut exister entre un objet et son image dans un miroir. En chimie, une molécule est dite chirale lorsqu'elle ne possède aucun axe de symétrie intrinsèque. Cette molécule présente alors un carbone asymétrique, et peut exister sous deux formes non superposables, désignées comme énantiomères.

Deux énantiomères ont donc les mêmes propriétés physiques (masse molaire, taille, polarité...). Ils peuvent néanmoins être différenciés par leur capacité à faire dévier le plan de polarisation d'une lumière polarisée. Ainsi, une molécule qui dévient la polarisation de la lumière vers la gauche sera dite « lévogyre » (noté (-)), tandis qu'une molécule qui dévient la polarisation vers la droite sera dite « dextrogyre », (noté (+)). Ces phénomènes de polarisation de la lumière, et plus précisément l'effet magnéto-optique, ont été décrits par J.B Biot et A. Fresnel¹ au début du XIX^{ème} siècle.

Grâce à cette méthode, la notion de chiralité moléculaire a été introduite par Louis Pasteur en 1848. A partir de cristaux d'acide tartrique qui coexistaient sous deux formes non superposables et qu'il triait alors à la main (Fig 1.a), Pasteur prépara des solutions d'acide tartrique à partir de ces sélections de cristaux. Il observa alors un effet de rotation du plan de polarisation de la lumière, dans un sens opposé pour les deux échantillons. La déviation du plan de polarisation par les solutions étant déjà considérée comme liée à la structure de la molécule, il en conclut que l'acide tartrique pouvait exister sous deux formes dissymétriques inverses l'une de l'autre².

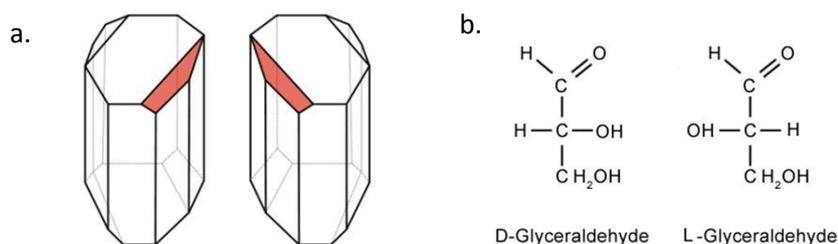


Fig 1 : a. Cristaux d'acide tartrique triés par Pasteur, b. D-(+)-glycéraldéhyde L-(-)-glycéraldéhyde

Puis, au début du XX^{ème} siècle, M. Fischer et M. Rosanoff furent les premiers à proposer un système de nomenclature, qui permettait de rendre compte de la chiralité des molécules, sans avoir à les dessiner en trois dimensions. Ainsi, ils ont désigné arbitrairement le (+)-glycéraldéhyde en *D*-(+)-glycéraldéhyde, car dans la représentation de Fischer, le groupe OH porté par le carbone asymétrique est à droite (*D=dexter*). L'énantiomère fut désigné *L*-(-)-glycéraldéhyde (*L=laevus*, Fig 1.b). Il n'y a donc aucun lien entre la mesure physique du pouvoir rotatoire et la nomenclature *D/L*. En 1949, J.M. Bijvoet³ confirmera expérimentalement que la configuration assignée arbitrairement à la nomenclature était juste.

Bien que R. Cahn, C. Ingold et V. Prelog⁴ aient proposé en 1966 le système de nomenclature *R*(*Rectus*) / *S* (*Sinister*) qui permet de déterminer sans ambiguïté la configuration absolue de n'importe quelle molécule, la nomenclature *D/L* reste la nomenclature de référence pour la description des constituants élémentaires du vivant.

b. Chiralité et biologie

La chiralité est omniprésente dans le monde du vivant. Deux classes de molécules chirales sont des constituants essentiels de la biologie : les sucres (utilisés pour la synthèse d'ADN), et les acides aminés (utilisés dans la synthèse de protéines, Fig 2). Ces deux classes de molécules ne sont présentes que sous la forme d'un seul énantiomère dans un organisme : les sucres sont exclusivement (*D*) tandis que les acides aminés sont principalement de type (*L*).

i. Les acides aminés

Les 20 acides aminés de type (*L*) distribués chez tous les êtres vivants constituent la base de la synthèse des protéines. Celles-ci sont issues de la traduction des ARN messagers (eux même copiés de l'ADN par le processus de transcription) et ont des rôles mécaniques (ex : cytosquelette), enzymatiques (ex : cycle de Krebs), de récepteur (ex : RCPG), de messenger (ex : hormone), de transport (ex : lipoprotéine). Ces acides aminés (*L*) abondent donc dans l'organisme et ont deux origines : l'une est endogène, l'autre est exogène (désignés comme acides aminés essentiels).

Cette spécificité énantiomérique de la biologie est une énigme pour la biochimie. Depuis longtemps, l'idée a été émise que l'explication pourrait se trouver dans l'espace. En effet, un précurseur des acides aminés, la glycine, a été découvert par spectroscopie dans un nuage stellaire⁵, et dans plusieurs météorites, des acides aminés ont également été découverts⁶ (environ 70, dont 8 composent les protéines). Certains présentent un excès énantiomérique (*e.e*) de type (*L*) et ce déséquilibre énantiomérique peut être expliqué par l'action des rayons X sous un champ magnétique⁷, conditions très répandues dans l'univers. En 2013, d'autres acides aminés ont encore été retrouvés dans des chondrites de l'Antarctique présentant un *e.e* de type (*L*)⁸. Une étude isotopique suggère même une synthèse chimique extraterrestre. Ainsi, l'hypothèse suivant laquelle la vie se serait développée dans un contexte majoritairement lévogyre apporté par des météorites expliquerait la spécificité énantiomérique du vivant (pour plus de détails⁹).

Néanmoins, des traces d'acides aminés de type (*D*) sont retrouvées dans l'organisme. Ils sont produits à l'aide d'isomérases, enzymes qui catalysent des réactions de type $A \rightarrow B$, où *A* et *B* sont des énantiomères. Par exemple, la *D*-sérine est synthétisée dans les astrocytes à partir de la *L*-sérine par la sérine-racémase^{10,11} et joue un rôle important de neuromodulateur. Le *D*-aspartate et la *D*-alanine ont également été retrouvés dans des cerveaux de rat, respectivement dans les cellules prolactines et certaines cellules de la glande pituitaire¹², qui ont des rôles endocriniens. Ces acides aminés (*D*) sont donc synthétisés localement et ont des effets métaboliques très précis.

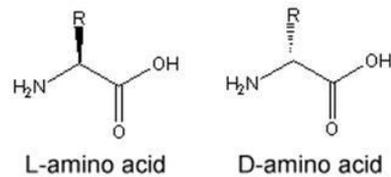


Fig 2 : (*L*)-acide aminé vs (*D*)-acide aminé
R représente la chaîne latérale de l'acide aminé

ii. Cas des médicaments

Il n'existe cependant pas de règle universelle capable de prédire l'activité biologique de deux énantiomères. C'est une problématique majeure rencontrée dans le domaine pharmaceutique, où par exemple deux énantiomères d'un médicament peuvent avoir des effets similaires, où l'un peut être thérapeutique et l'autre toxique (ex : thalidomide), ou les deux énantiomères sont tous deux thérapeutiques, mais pour des pathologies différentes (ex : (*L*)-Thyroxine traite l'hypothyroïdie, tandis que la (*D*)-Thyroxine traite l'hypercholestérolémie). La détermination *d.e.e* d'une formulation après synthèse est donc particulièrement importante.

iii. La reconnaissance énantiosélective

Pour qu'une molécule ait une activité biologique, elle doit interagir avec un récepteur, puis cette reconnaissance induira une transduction moléculaire qui se traduira par un effet physiologique. Aussi bien dans le cadre des effets induits par les acides aminés (*D*) que dans le cas de médicaments, il existe une discrimination d'origine biologique entre les énantiomères. Cette discrimination ne se fait qu'à l'étape qui initie la réponse, c'est-à-dire au moment de la reconnaissance entre le ligand chiral et le récepteur. Les premières observations expérimentales faites en ce sens datent du XIX^{ème} siècle. Pasteur remarqua en 1858 que la moisissure *Penicillium glaucum* métabolisait le (+)-tartrate plus rapidement que le (-)-tartrate. En 1886, A. Piutti remarqua quant à lui, que la (+)-asparagine avait un goût sucré, tandis que l'énantiomère était insipide. Pasteur conclura alors que « le système nerveux pourrait être lui-même dissymétrique »¹³. Ces observations allaient alors dans le sens de l'énantiosélectivité des récepteurs.

L'énantiosélectivité désigne la capacité d'un récepteur à interagir majoritairement avec un énantiomère. Cela implique que l'autre énantiomère peut interagir aussi avec ce récepteur, mais

avec une moins bonne affinité. Lorsqu'un récepteur n'interagit pas avec l'autre énantiomère, il est qualifié d'énantiospécifique.

Conceptuellement, une avancée significative pour expliquer l'énantiosélectivité biologique a été présentée en 1930 par L. Easson et E. Stedman¹⁴. Les interactions entre un ligand chiral et son récepteur sont associées aux groupes fonctionnels du ligand complémentaire de ceux du récepteur. Easson et Stedman ont postulé que les différences d'activités résultent d'une différence d'interaction des deux énantiomères avec le récepteur au niveau du site de reconnaissance. L'énantiomère le « plus actif » interagit au minimum avec trois sites distincts du récepteur, tandis que la forme la « moins active » interagit avec un minimum de deux sites (fig 3.a)

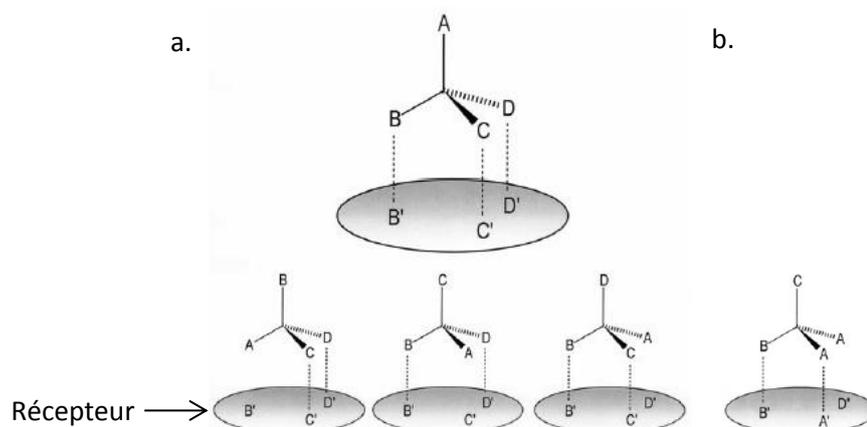


Fig 3 : Modèle d'Easson et Stedman pour une interaction entre un ligand chiral et son récepteur biologique. a. Le stéréoisomère le plus actif (en haut) interagit avec 3 sites du récepteur, tandis que les autres stéréoisomères n'interagissent qu'avec 2 sites. b. Interaction moléculaire entre un récepteur et un analogue non chiral¹⁵.

Remarquons qu'un analogue structural non chiral pourrait interagir avec deux sites de reconnaissance au moins et peut avoir la même activité biologique que l'énantiomère le moins actif¹⁶ (Fig 3.b).

A. Ogston^{17,18}, qui semblait ignorer le modèle de Easson et Stedman, proposa dès 1948 un modèle d'attachement en trois points pour expliquer la stéréosélectivité enzymatique pour la transformation du citrate, molécule *prochirale*, en aminomalonate¹⁹. Le concept d'Easson et Stedman pour la discrimination stéréosélective était alors étendu au concept de *prochiralité* (fig 4).

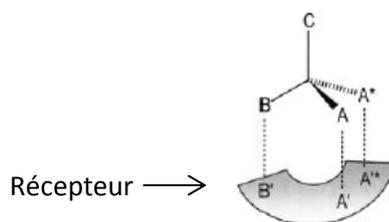


Fig 4 : Interaction en 3 points entre une molécule *prochirale* et son récepteur¹⁵.

Ici, dans la molécule C_{AA^*BC} , les groupes A et A* sont chimiquement équivalents, la molécule n'est pas chirale. Néanmoins, d'un point de vue stérique, ces groupes sont dit énantiotopiques: si le site A'* du récepteur est le site catalytique, seul A* subira la transformation chimique.

Dans les années 1990, V. Sokolov et N. Zefirov²⁰ ont développé le modèle d'Ogston, en proposant d'examiner la stéréosélectivité sous un angle dynamique plutôt que statique. Dans ce modèle, un ligand *prochiral* interagit en deux points seulement avec le récepteur, et l'énantiosélectivité dépend de l'orientation des sites énantiotopiques vis-à-vis du site actif de l'enzyme (Fig 5).

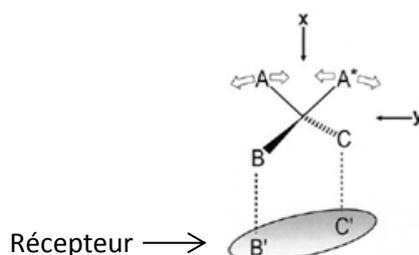


Fig 5 : le modèle du « rocking tetrahedron » développé par Sokolov et Zefirov
Le substrat C_{AA^*BC} interagit en deux points de contact avec l'enzyme ($B \cdots B'$ et $C \cdots C'$)¹⁵

Dans ce modèle, les groupes A et A* occupent des espaces identiques qui se recouvrent, et l'énantiosélectivité dépend du sens des interactions avec le site actif. Si les interactions se font dans le sens X de la figure 5, il n'y aura pas de sélectivité compte tenu de la flexibilité des groupes A et A*. Si les interactions se font dans le sens Y, le processus catalytique sera sélectif d'un groupe énantiotopique, voire spécifique.

Cette idée d'une reconnaissance moléculaire dynamique a été reprise par T. Booth^{21,22}, grâce à des études de séparation d'acide α -alkylcarboxylique sur des phases chirales stationnaires. Dans son modèle, il décrit un mécanisme de reconnaissance piloté par un changement de conformation du récepteur en trois étapes :

- Formation d'un *pro*complexe où le ligand et le récepteur sont en contact ;
- Ajustement des conformations qui optimisent la stabilité du complexe ;
- Formation de nouvelles interactions.

In fine, ce mécanisme aboutit à une reconnaissance chirale et décrit un processus d'ajustement induit (*Induced Fit Process*). D'après les auteurs, il est généralisable à toutes les classes de récepteurs chiraux.

Enfin, A. Mesecar et D. Koshland²³ ont montré en 2000 que le modèle d'interactions en trois points n'était pas valide dans le cas d'une enzyme, l'isocitrate deshydrogénase (IDH). En examinant les structures cristallographiques de l'enzyme, les auteurs ont mis en évidence que sans Mg^{2+} , l'isomère (L) se liait au site actif, tandis qu'en présence de Mg^{2+} , l'isomère (D) de l'isocitrate se retrouvait dans le site actif. Les auteurs montrent également que les deux isomères partagent trois sites d'interaction, et que c'est un quatrième qui permet d'expliquer l'énantiosélectivité observée.

Ces observations soulignent l'importance de la structuration du récepteur. Et dans le cas de molécules biologiques complexes comme les protéines ou les acides nucléiques, le pH, la force

ionique, la nature des ions, la température et les concentrations sont autant de paramètres pouvant influencer la structure de ces macromolécules naturelles et donc leur énantiosélectivité.

La poursuite des investigations fondamentales concernant les relations chiralité/activités biologiques comme la nécessité de contrôler les *e.e* dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques demande la mise au point de systèmes analytiques énantiosélectifs. Pour cela, deux méthodes sont utilisées : la séparation sur des phases stationnaires chirales et la détection en phase homogène. La première étape pour le développement de ces méthodes est le « *design* » d'un récepteur énantiosélectif.

I-2- les récepteurs énantiosélectifs

Différentes stratégies pour la détection ou la séparation d'énantiomères ont déjà été décrites dans la littérature. Il paraît important de distinguer dès à présent les sélecteurs, les indicateurs et les récepteurs énantiosélectifs. Les premiers servent à séparer des énantiomères, ils discriminent les molécules chirales suivant leurs carbones asymétriques. Les indicateurs sont des molécules qui interagissent spécifiquement avec une classe de molécules chirales (acides aminés ou binol par exemple). Enfin, les récepteurs sont sélectionnés pour reconnaître spécifiquement une molécule, et dans certains cas, un énantiomère de cette molécule.

a. Les sélecteurs énantiosélectifs

Les sélecteurs chiraux, autrement appelés sélecteurs conventionnels, sont utilisés dans les méthodes séparatives analytiques ou préparatives. Ils permettent de déterminer des *e.e* mais ne sont pas spécifiques d'une molécule ou d'une classe de molécules. Ils peuvent être classés suivant leur structure chimique et le type d'interactions mises en jeu lors des interactions avec les énantiomères. Ainsi, on distingue cinq familles de sélecteurs (Fig 6).

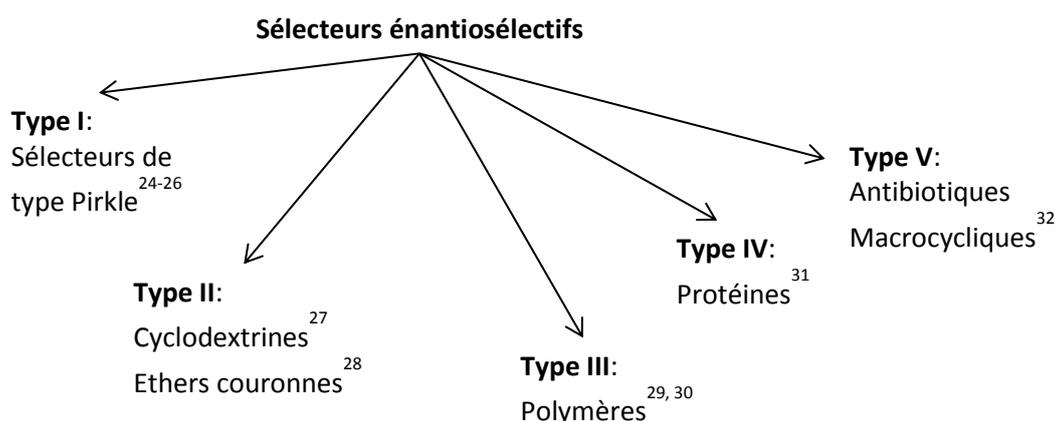


Fig 6 : Différentes classes de sélecteurs énantiosélectifs.

Ils sont très largement couplés à des méthodes séparatives, à en juger par le grand nombre de phases stationnaires chirales disponibles sur le marché (plus de 100). Néanmoins, ces sélecteurs souffrent encore de leur manque de spécificité. De nombreuses mises au point sont nécessaires. Par

exemple, la mesure d'*e.e* nécessite une calibration avec des molécules énantiomériquement pures³³, ce qui n'est pas toujours réalisable.

Une alternative pour ces mesures d'*e.e* est l'utilisation d'indicateur chiraux.

b. Les indicateurs énantiosélectifs

L'utilisation des indicateurs chiraux est basée sur la chimie supramoléculaire *via* la formation de complexes molécule-hôte. E. Anslyn³⁴ a largement développé cette approche dans le cadre de la mesure rapide d'*e.e* d'acides aminés, notamment avec la technique d'*Indicator Displacement Assay (IDA)*, où le transducteur de la reconnaissance hôte-molécule est un fluorophore. En 2008, un de ses articles présentait l'utilisation d'une molécule hôte à deux centres chiraux capable de complexer un ion cuivre. Cet ion cuivre peut également interagir avec un indicateur colorimétrique, le Chrome Azurol S (CAS) pour former un complexe. Lorsque des acides aminés sont introduits dans une solution avec ce complexe, ils vont prendre la place de l'indicateur coloré ce qui va provoquer un changement des propriétés d'absorption de l'indicateur : il est bleu lorsqu'il est complexé et jaune lorsqu'il est libre (fig 7). L'idée centrale est que les séries (*D*) et (*L*) n'ont pas la même affinité pour l'indicateur. Cette propriété de changement de couleur permet, à l'œil nu, d'estimer la pureté énantiomérique d'une solution.

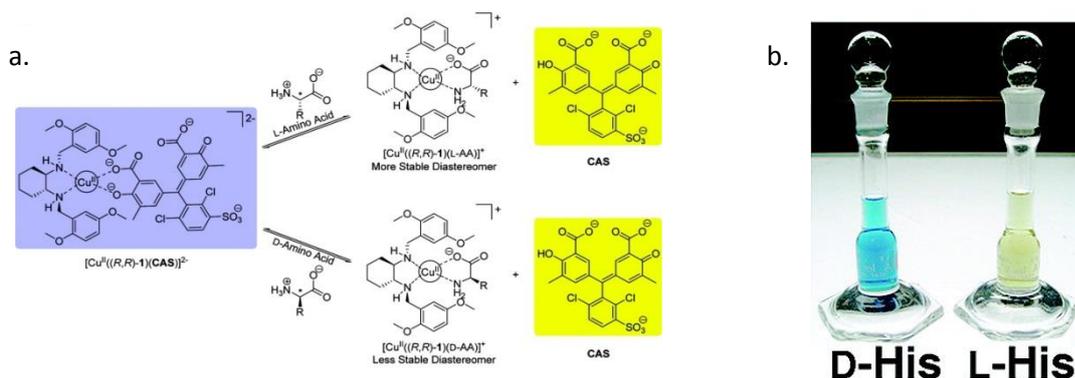


Fig 7 : a. Test par déplacement d'indicateur pour des acides aminés, basé sur le déplacement du Chrome Azurol S (CAS) d'un complexe à base de cuivre : le CAS est bleu lorsqu'il interagit avec le cuivre et jaune après déplacement, b. Illustration de l'énantiosélectivité de cette méthode avec l'Histidine : seule la forme (*L*) interagit avec le complexe pour libérer le CAS³⁴.

Les courbes de calibrations obtenues en dosage spectrométrique ont cependant de larges incertitudes (~10 %), ce qui limite le seuil de détection. Dans un autre article, E. Anslyn montre qu'il est possible d'adapter cette méthode à l'usage de plaque à 96 puits pour la mesure rapide *e.e*³⁵, avec une limite de détection à quelques pourcents.

Une autre méthode, cette fois basée sur l'utilisation d'un indicateur électrochimique, a été proposée par J. Tucker³⁶ en 2010. Dans cette approche, les auteurs ont utilisé un indicateur à base de ferrocène dont l'interaction avec une cible chirale modifie son potentiel standard apparent (Fig 8). Néanmoins, cette méthode est restreinte à la famille des binols.

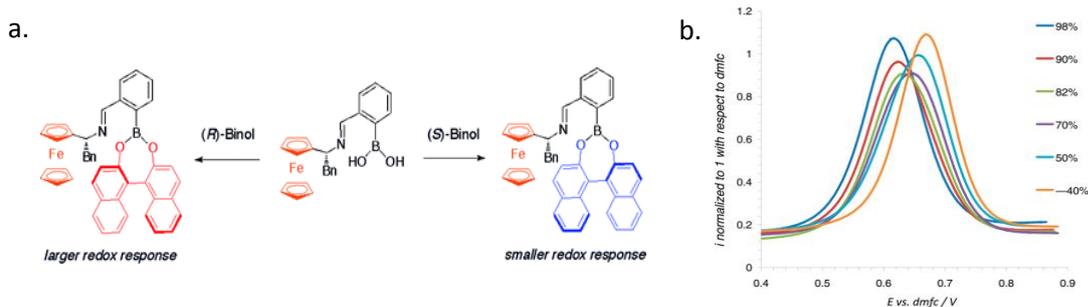


Fig 8 : a. Complexes formés entre l'indicateur électrochimique et les (R) et (S)- binols³⁶;
 b. Voltammogrammes à vagues carrées obtenus pour différents % d'*e.e* en (S)-binol: plus cet excès agmente, plus le E_0^{app} de la sonde est décalé vers des potentiels anodiques³⁶.

Ces indicateurs chiraux représentent une alternative très intéressante à la détermination d'*e.e* basée sur des méthodes séparatives. Mais les limites de détections sont encore élevées, de l'ordre de quelques pourcents, et les mauvaises constantes d'affinités nécessitent l'utilisation de concentrations en analytes élevées.

Ces techniques ne sont donc pas adaptées pour la mesure de traces d'énantiomères. Un moyen d'abaisser les seuils de détection et la quantité d'analyte nécessaire est d'utiliser un récepteur spécifique d'une cible.

c. Les récepteurs énantiosélectifs

Trois stratégies distinctes ont déjà été explorées afin de proposer des récepteurs avec une bonne énantiosélectivité et une bonne affinité : la formation de polymères à empreintes moléculaires (*Molecular Imprinted Polymers, MIPs*), les anticorps et l'approche combinatoire.

i. Polymères à empreintes moléculaires (MIPs)

L'impression moléculaire est un procédé par lequel des monomères fonctionnels sélectionnés s'auto-assemblent autour d'une molécule patron et polymérisent en présence d'un agent de polymérisation/réticulation^{37,38,39}. Une fois la molécule patron extraite du polymère obtenu, il en résulte une cavité complémentaire en forme et en fonctionnalité. Elle interagit avec les molécules identiques ou de structures proches de celle de la molécule patron (Fig 9)

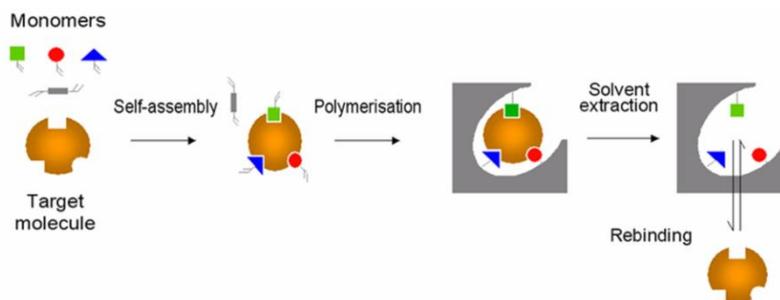


Fig 9 : Principe général de la préparation de MIPs³⁹.

Le polymère à empreintes moléculaires « garde en mémoire » la forme et les groupements fonctionnels de la molécule patron. Lorsque le polymère est fabriqué contre une molécule chirale, il sera potentiellement énantiosélectif.

Les MIPs ont en général une très grande affinité pour leur cible, comparable à celle des anticorps pour leurs antigènes. Pour cette raison, ils ont été surnommés « *antibodies mimic* »⁴⁰.

Ils peuvent être utilisés comme matrice d'affinité en séparation ou comme élément de reconnaissance dans des capteurs. Ainsi, les MIPs ont permis de séparer par chromatographie des énantiomères de dérivés d'acides aminés⁴¹, de peptides⁴², de β -bloquants⁴³, d'anti-inflammatoires non stéroïdiens⁴⁴ et d'antibiotiques⁴⁵.

Néanmoins, l'utilisation des MIPs dans les techniques séparatives présentent des inconvénients dus à une grande disparité des sites énantiosélectifs et non-spécifiques situés à la surface du polymère. Ceci entraîne donc une efficacité contestable⁴⁶. La synthèse de MIP nécessite également une grande quantité de molécules empreintes, ce qui peut être problématique pour les molécules d'intérêt difficile à synthétiser ou disponibles en quantité limitée. Enfin, les conditions de polymérisation peuvent être incompatibles avec la stabilité d'une biomolécule par exemple.

ii. Anticorps

Les anticorps sont des protéines produites par le système immunitaire destinées à interagir avec des molécules du *non-soi*, c'est-à-dire dirigées contre des ligands inconnus de l'organisme. Ces séquences reconnues par les anticorps sont appelées épitopes ou encore déterminants antigéniques.

Les anticorps utilisés en chimie analytique sont plus précisément des glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines (IgG) constitués de deux chaînes lourdes **H** et deux chaînes légères **L**, reliées entre elles par des ponts disulfures (lien S-S covalent entre deux cystéines). Ces chaînes peptidiques forment une structure en Y et sont constituées de trois motifs constants **C** (caractéristiques de l'espèce dont est issu l'anticorps) et d'un domaine variable **V**, impliqué dans la reconnaissance de l'épitope (Fig 10).

Les anticorps sont obtenus par immunostimulation chez les rongeurs (classiquement, souris, lapin et rat). L'épitope d'intérêt est mélangé à l'adjuvant complet de Freund (émulsion d'eau, d'huiles, d'émulsifiant et de bactéries mortes) qui est injecté par voie intrapéritonéale (dans le péritoine, membrane séreuse qui tapisse l'abdomen). La réaction immunitaire va alors provoquer la production d'ascite, c'est-à-dire un épanchement intra-abdominal, dans lequel sont contenues les cellules immunitaires productrices d'anticorps dirigées contre l'épitope désiré. Le plus souvent, cette méthode permet d'obtenir des anticorps polyclonaux, c'est-à-dire synthétisés par des cellules immunitaires différentes. Ces anticorps polyclonaux n'ont pas les mêmes sites de fixation sur l'antigène et ont des affinités différentes. Après la production d'ascite, s'ensuit donc une procédure de purification, destinée à isoler des anticorps monoclonaux. Ces procédures sont très lourdes en termes de temps et d'investissement.

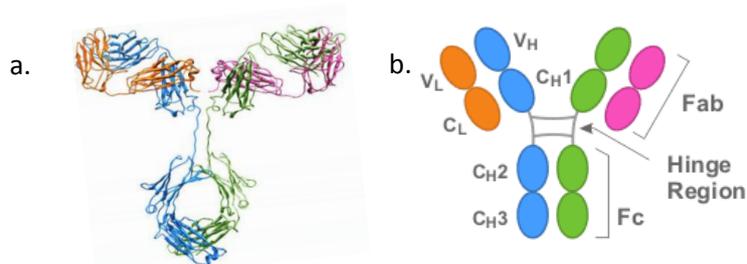


Fig 10 : a. IgG, les sections vertes et bleues correspondent aux chaînes lourdes (H), les sections roses et oranges correspondent aux chaînes légères (L). b. V = variable ; C = constant, H = Heavy ; L = light ; Fc = fragments cristallisables ; Fab = Fragment antigen Binding

Cette classe de récepteur reste néanmoins très utilisée en chimie analytique, car ces objets ont de très bonnes affinités pour leur antigène ($K_d \sim \text{nM}$).

Il est donc tout à fait possible d'immuniser des animaux contre une molécule chirale, et d'obtenir des anticorps monoclonaux énantiosélectifs. C'est ce qu'a montré Karl Landsteiner⁴⁷ en 1917. Depuis, les anticorps énantiosélectifs ont été décrits pour des acides aminés⁴⁸⁻⁵⁰, des médicaments^{51,52} ou encore des acides α -hydroxylés⁵³.

La production d'anticorps n'est cependant pas sans limite. En effet, il reste difficile d'immuniser des rongeurs avec des toxines qui ne sont pas tolérées par son organisme. De plus, les petites molécules sont faiblement immunogènes, il peut donc être très difficile d'obtenir des anticorps correspondants. Enfin, lorsqu'un stock d'anticorps est épuisé, toute une campagne d'immunisation doit être programmée. Le stock suivant d'anticorps n'est pas assuré d'être à la même concentration, ni d'avoir la même affinité pour sa cible que le précédent.

iii. Approche combinatoire

La chimie combinatoire est une approche moléculaire et statistique qui repose sur la mise au point de méthodes de synthèse à haut débit (création d'une banque de molécules) et de criblage de vastes mélanges de molécules construites par combinaison d'unités de base. Cette approche a pour objectif de pouvoir déterminer, parmi N molécules, laquelle (ou lesquelles) aura (ou auront) les propriétés désirées.

Dans le cadre de la discrimination chirale, différentes stratégies ont vu le jour afin de cribler des banques de récepteurs chiraux de faible masse moléculaire (à l'opposé des anticorps).

Lors de l'élaboration d'une stratégie combinatoire, il est tout d'abord nécessaire de considérer la disponibilité et la nature des unités synthétiques (synthons) qui interviendront dans la synthèse de la bibliothèque. Sur le plan chimique, la formation des nouvelles liaisons entre chaque synthon doit conduire à une structure stable dans les conditions de synthèses et lors des tests.

Une fois cette banque disponible, il est nécessaire d'y rechercher les candidats qui possèdent les propriétés désirées. Pour cela, trois stratégies sont possibles^{54,55}.

La première est dite réciproque et a été introduite par W. Pirkle⁵⁶. Un énantiomère de la cible est fixé sur un support chromatographique, cette phase stationnaire servant alors à passer en revue une banque de composés racémiques. Celui ayant eu la meilleure affinité pour la cible chirale immobilisée est ensuite préparé sous une forme énantiomériquement pure et fixé sur un support chromatographique. La phase stationnaire, ainsi obtenue, permet une très bonne séparation des énantiomères⁵⁷. Cette approche a notamment permis à K. Lewandoski de séparer des dérivés d'acides aminés à partir d'une banque de dihydropyrimidines⁵⁸ de plus de 140 candidats.

Une deuxième approche consiste à greffer sur une colonne chromatographique une bibliothèque de récepteurs chiraux énantiomériquement purs plutôt qu'un énantiomère de la cible. Les propriétés énantiosélectives de cette colonne sont testées par injection de composés racémiques. Lorsqu'une séparation est observée, plusieurs colonnes sont préparées à partir de la même bibliothèque, mais cette fois chaque colonne contiendra une moins grande diversité de récepteurs. En répétant cette démarche, les colonnes sont préparées successivement avec des bibliothèques de plus en plus réduites, ce qui conduit à isoler le récepteur énantiosélectif optimal. Dans cette approche, le nombre de colonnes nécessaires est inférieur au nombre de récepteurs chiraux présents dans la banque initiale. Ainsi M. Chiari⁵⁹ a pu séparer des dérivés d'acides aminés grâce à une banque de 8000 cyclopeptides.

Enfin, M. Weingarten⁵⁵ a développé une approche combinatoire originale non séparative pour la détection énantiosélective de dérivés d'acides aminés. Dans ce cas, une bibliothèque de récepteurs chiraux potentiels a été synthétisée à partir de 3 types de synthons, ce qui a permis de synthétiser 60 candidats. Chaque candidat a été greffé sur une bille de polystyrène. Parallèlement, des énantiomères de dérivés d'acides aminés ont été marqués par un chromophore bleu ou rouge (associé respectivement aux dérivés d'acide aminé de type *L* et *D*). Lorsque les billes fonctionnalisées sont en présence d'un mélange racémique de cibles marquées, elles peuvent être observées au microscope optique, trois cas se présentent alors :

- La bille est restée incolore : le récepteur n'est pas spécifique de la cible ;
- La bille est marron : les deux énantiomères ont été reconnus par le récepteur ;
- La bille est rouge ou bleue : le récepteur est bien énantiosélectif voire énantiospécifique.

Ainsi, Weingarten et ses collaborateurs ont pu identifier des récepteurs chiraux de dérivés d'acides aminés. La chimie combinatoire est donc un outil performant qui permet de découvrir de nouveaux récepteurs chiraux à faibles masses moléculaires pour la chimie analytique ou la chimie préparative.

I-3- Récepteurs chiraux à base d'acides nucléiques : les aptamères

a. Sélection

Sur la base des modèles développés pour expliquer la reconnaissance énantiospécifique de substrats enzymatiques, il apparaît que les polymères biologiques sont capables de modifier leur arrangement dans l'espace afin de s'adapter à la forme et aux fonctionnalités chimiques de leur cible. C'est un avantage devant les récepteurs synthétiques.

L'approche statistique que propose la chimie combinatoire permet quant à elle de sélectionner parmi une large banque de candidats, celui (ou ceux) qui présentent la (ou les) meilleure(s) affinité(s). Ainsi, une bibliothèque de polymères biologiques pourrait être passée en revue afin d'en isoler le ou les meilleurs candidat(s) pour la reconnaissance moléculaire voulue. Dans ce cas, les synthons utilisés sont bifonctionnels, et sont des nucléotides (de type ribose ou désoxyribose) ou des acides aminés. Dans ce travail ne sera détaillée que l'utilisation de nucléotides.

Ces approches ont été développées dans les années 90 avec les acides nucléiques, par trois groupes indépendants⁶⁰⁻⁶². A. Ellington et J. Szostak⁶¹ ont alors nommé ces objets "aptamère", néologisme du mot latin *aptus* (approprié à, se lie à) et du grec *meros* (unité de base d'un polymère), désignant ainsi un polymère spécifique d'une cible. C. Tuerk et L. Gold⁶⁰ ont quant à eux nommé la procédure de sélection *SELEX* (Evolution Systematique de Ligands par Enrichissement Exponentiel), dont le principe est exposé figure 11.

La première étape pour définir une séquence d'aptamère dirigée contre une cible d'intérêt par chimie combinatoire est de constituer la banque d'acides nucléiques. Les brins d'ADN ou d'ARN de séquences aléatoires sont composés de séquences complémentaires d'amorce de PCR aux extrémités 5' et 3' afin d'initier la phase d'amplification après la sélection. Entre ces séquences, un nombre aléatoire de nucléotides constitue la banque en elle-même. Comme il n'existe que quatre nucléotides naturels, pour n nucléotides disposés aléatoirement dans la séquence, 4^n molécules différentes coexisteront dans la bibliothèque. Les aptamères décrits dans la littérature ont des tailles variables de 20 à 80 nucléotides.

La seconde étape consiste à séparer les aptamères de la banque en fonction de leur affinité pour la cible. Pour cela, les aptamères sont incubés avec la cible. C'est alors que l'étape la plus critique intervient : la séparation entre les complexes aptamère/cible et les aptamères restés libres.

Initialement, Tuerk et Gold⁶⁰ séparaient les aptamères libres et complexés en utilisant une technique de filtration sur membrane de nitrocellulose. Ellington et Szostak, quant à eux, utilisèrent une séparation par chromatographie d'affinité, où la cible est immobilisée sur une surface. D'autres techniques de séparation ont par la suite été développées, comme la cytométrie de flux⁶³, l'électrophorèse capillaire⁶⁴, la résonance plasmonique de surface⁶⁵, ou encore l'AFM⁶⁶⁻⁶⁸.

Les aptamères sélectionnés sont ensuite élués et amplifiés par la technique de *Réaction en Chaîne par Polymérase* (PCR) pour générer une nouvelle banque d'oligonucléotides, enrichie en séquences

potentiellement capables de se lier spécifiquement à la cible. Des mutations, susceptibles d'améliorer ou de détériorer l'affinité sont généralement introduites à cette étape. Le cycle de séparation est alors à nouveau engagé, jusqu'à ce qu'une séquence spécifique se détache.

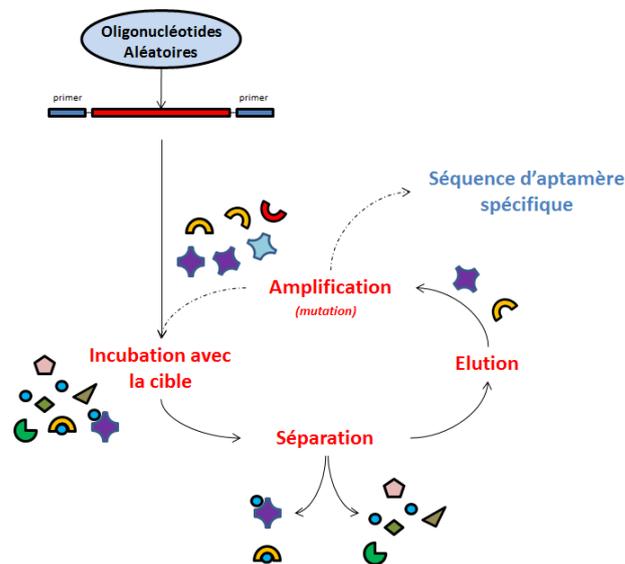


Fig 11 : Schéma général de la procédure *SELEX*.

La banque est constituée de milliers de séquences différentes qui sont sélectionnées par des méthodes séparatives, jusqu'à isoler une séquence consensus.

Cette méthodologie d'isolement de récepteur a permis de déterminer des séquences spécifiques d'ADN ou d'ARN capables de reconnaître des ions Zn^{2+} ⁶⁹ et K^+ ⁷⁰, des protéines⁷¹⁻⁷³, des peptides⁷⁴, des acides aminés^{75,76} et dérivés^{77,78}, des nucléotides^{79,80} ou encore des médicaments⁸¹ et des insecticides⁸².

Lorsque la cible utilisée pour la sélection des aptamères est chirale, le *SELEX* peut permettre de sélectionner des oligonucléotides avec une forte énantiosélectivité. Cette propriété a permis de proposer des phases stationnaires à base d'aptamère en série ADN pour la séparation énantiosélective d'oligopeptides⁸³, de nucléotides et de dérivés d'acides aminés⁸⁴. Des aptamères en série ARN ont également été utilisés pour séparer les énantiomères de l'histidine⁸⁵, du tryptophane⁸⁶ et de l'arginine⁸⁷. Dans ce dernier cas, M. Famulok⁸⁸ a montré que l'énantiomère de l'aptamère (*L*-RNA, dont la chiralité est due au ribose) était capable de reconnaître l'énantiomère de la cible, la *D*-arginine.

Cette méthodologie *SELEX* est donc très performante, puisqu'elle permet de sélectionner des aptamères spécifiques énantiosélectifs. C'est une alternative très intéressante puisqu'une fois la séquence déterminée, les aptamères peuvent être synthétisés à la demande, contrairement aux anticorps qui nécessitent une nouvelle campagne d'immunisation.

Cependant, dans le cas de séparation sur support, la cible est immobilisée par l'intermédiaire d'un bras espaceur. Les aptamères sont donc contraints à ne pas interagir avec une partie de la molécule cible. De plus, dans le cas de la sélection par chromatographie d'affinité, il est préalablement

nécessaire de faire une première sélection négative, pour éliminer les séquences se liant de manière non spécifique au support. Bien que les aptamères puissent avoir une affinité de l'ordre du nanomolaire, ils restent globalement moins affins que les anticorps. Cette technologie reste donc à optimiser.

b. Généralité sur les acides nucléiques : composition et structure

Pour bien comprendre l'origine des propriétés de reconnaissance des aptamères vis-à-vis de leur cible, il faut s'intéresser à la nature chimique des acides nucléiques, qui leur permet une très grande richesse de conformation. Associés aux nombreuses fonctionnalités pouvant interagir entre elles ou avec d'autres molécules, les acides nucléiques peuvent alors adopter des structures tridimensionnelles potentiellement complémentaires en forme et en fonctionnalité d'une autre molécule.

Les ADN et les ARN sont des polymères biologiques qui résultent de l'association de nucléotides. Les nucléotides sont au nombre de cinq, et sont constitués d'un groupement phosphate, d'un pentose et d'une base azotée (Fig 12). L'enchaînement de ces bases azotées constitue la structure primaire de l'ADN.

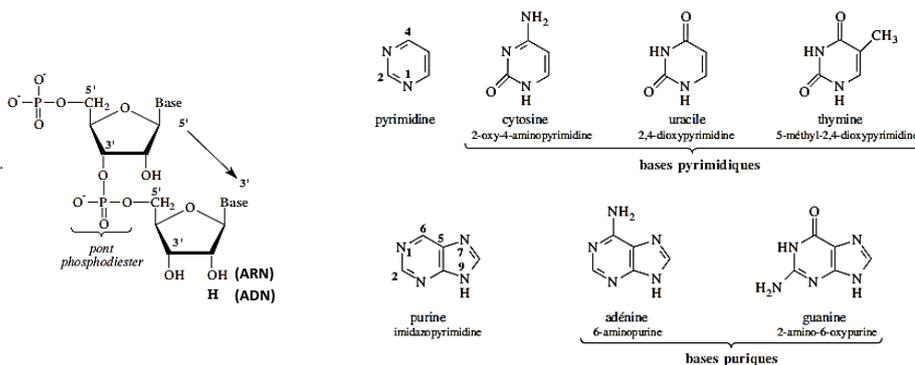


Fig 12 : Représentation schématique des nucléotides constituant les acides nucléiques.

Les brins d'ADN sont faits d'adénine (A), de guanine (G), de cytosine (C) et de thymine (T), tandis que dans l'ARN, la thymine est remplacée par l'uracile (U). Les bases (A) et (G) sont puriques, (C), (T) et (U) sont pyrimidiques. Ces nucléotides sont liés par une liaison phosphodiester entre le phosphate en 5' du ribose et le groupe 3'-OH du nucléotide adjacent. En terme de nomenclature, on distingue les extrémités d'un brin d'ADN par le numéro du carbone du ribose qui n'est pas lié à une base. On parle donc des extrémités 5' et 3'.

Une particularité de l'ARN est que le ribose possède un groupement hydroxyle en 2'. Sur le plan chimique, cette fonction alcool rend l'ARN sensible à l'hydrolyse alcaline. La présence des deux oxygènes en position *cis* sur les positions 2' et 3' permet la cyclisation du phosphate, qui provoque la rupture de la chaîne nucléotidique (fig 13). L'ARN a donc une stabilité chimique moins bonne que l'ADN.

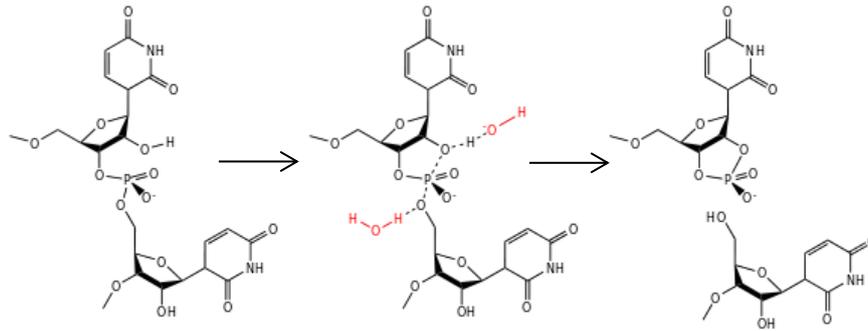


Fig 13 : Hydrolyse alcaline de l'ARN conduisant à la rupture du brin.

De plus, l'amplification par PCR de brins d'ARN nécessite que ces brins soient d'abord transcrits en ADN: c'est une RT-PCR (*Reverse Transcriptase-PCR*), qui constitue donc une étape supplémentaire de traitement dans une procédure déjà lourde.

c. Interactions entre bases

L'ADN fut décrit par J. Watson et F. Crick⁸⁹ sous la forme d'un double brin. C'est effectivement dans cette configuration qu'il se retrouve dans le noyau cellulaire. Cet assemblage est un dimère de brins dont les séquences sont complémentaires : l'adénine s'apparie avec la thymine via deux liaisons hydrogène, la cytosine et la guanine s'apparient, quant à elles, avec trois liaisons hydrogène (Fig 14). Plus l'appariement entre deux brins contient de liens guanine-cytosine, plus le lien entre les brins est fort.

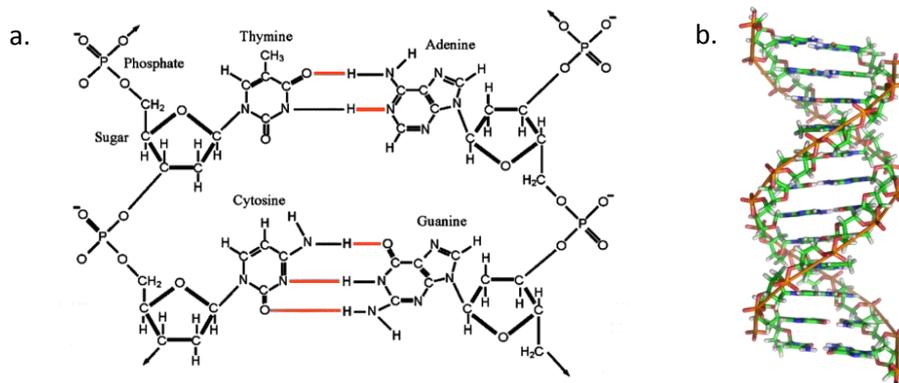


Fig 14 : a. Appariement de bases dans un double brin d'ADN.
b. Les deux brins complémentaires sont antiparallèles (5'-3' vs 3'-5').

Il est également possible que l'adénine interagisse avec une cytosine, et la guanine avec une thymine. On parle alors d'appariement de type *Wobble* (bancale), plutôt que d'appariement de type *Watson-Crick*.

Dans le cas de simples brins d'acides nucléiques comme les aptamères, des appariements de bases peuvent se faire au sein de ce brin unique. Le repliement conduit à la formation d'une structure en tige-boucle (Fig 15). La stabilité de la zone de complémentarité dépend de sa longueur, de la

proportion d'appariement de bases (*AT*) et (*GC*) et de la présence d'éventuels mésappariements ou d'appariements *Wobble*. La nature de la boucle est également très importante : la longueur optimale est comprise entre 5 et 8 nucléotides. Certaines boucles de quatre bases échappent à cette règle : ce sont les *tétraboucles*^{90,91}.

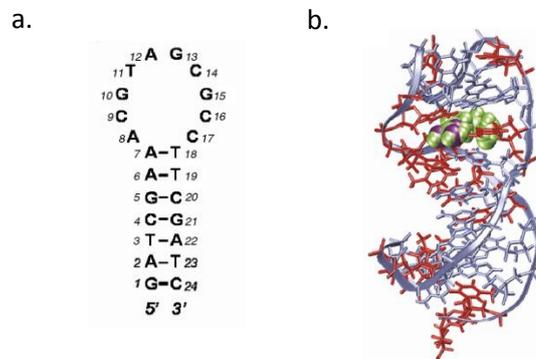


Fig 15 : a. Structure en tige prédite par le logiciel *mfold*, b. repliement de l'aptamère autour de sa cible, *L-arm* (PDB 1OLD)⁹²

Il existe aussi l'appariement de type Hoogsteen⁹³. Ce type d'interaction (fig 16) implique une base pyrimidique et une face d'une base purique différente de la face Watson-Crick : ce sont les positions N-7 et le groupement *oxo* ou *amino* en position 6 (respectivement pour la guanine et l'adénine) qui sont impliqués.

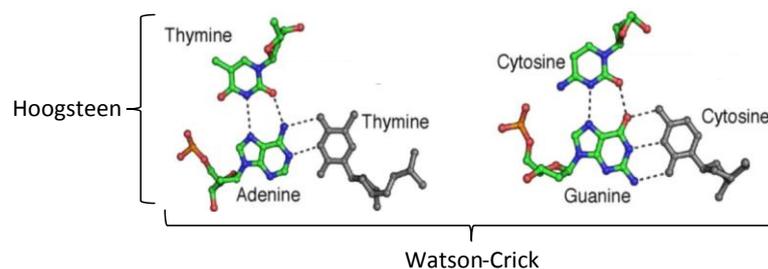


Fig 16 : Représentation des interactions Watson Crick vs Hoogsteen⁹⁴

Ce type d'appariement permet à un troisième brin d'interagir avec une double hélice déjà formée⁹⁵ pour former des triplex. Les appariements d'*Hoogsteen* sont notamment rencontrés dans la structure secondaire des ARN de transfert, et stabilisent leurs structures.

Ces appariements se rencontrent également dans une structure tertiaire de plus en plus étudiée : le quadruplexe de guanine ou *G-quartet*. Dans ces quadruplexes, quatre guanines sont alignées dans un plan grâce à des liaisons hydrogènes impliquant les faces *Watson-Crick* avec celles de types *Hoogsteen* de la guanine voisine. Il en résulte une tétrade (G-G-G-G) (Fig 17). Ces quartets de guanine sont stables par *stacking* des orbitales π de bases azotées, et grâce à un ion K^+ intercalé entre deux plans de guanines.

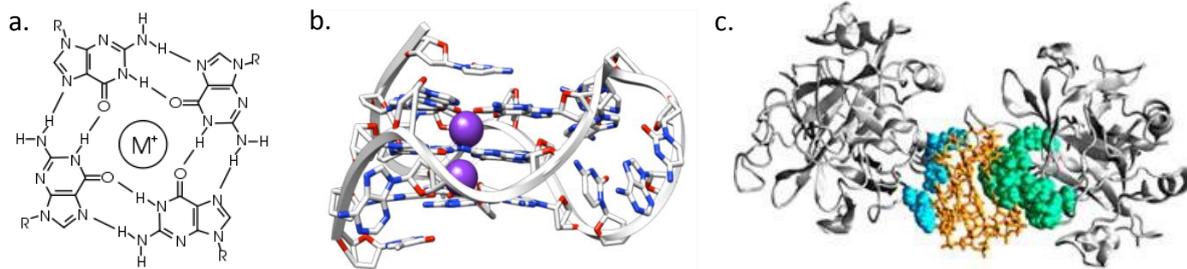


Fig 17 : a. G-quartet vu du dessus, M^+ = ion monovalent,
 b. Modélisation d'un G quartet à 2 plans de guanine, en violet un monocation,
 c. L'aptamère anti Thrombine est un G-quartet (en jaune) et lie deux thrombines par l'intermédiaire de zone d'interaction (en vert et bleu)⁷¹.

Bien que cela ne soit pas intuitif, les interactions de type π -stacking entre bases azotées adjacentes sont au moins aussi importantes que les interactions complémentaires de type Watson-Crick. En effet plusieurs études^{96,97} ont déjà montré que ce π -stacking contribuait à plus de 50 % dans l'énergie libre de stabilisation d'appariement de brins d'ADN. Les bases azotées étant aromatiques, elles ont un caractère hydrophobe. De ce fait, les bases minimisent leur exposition au solvant grâce à ce type d'interaction.

Dans le cadre d'interactions entre oligonucléotides et petites molécules, des appariements de type *Pseudo Base Pairing* ont également été décrits^{98,99}. Il s'agit dans ce cas d'interaction hydrogène avec les bases azotées (faces Watson-crick ou Hoogsteen) ou le ribose avec des sites donneur ou accepteur de proton du ligand⁹⁹.

d. Conformations du squelette Phosphate-Ribose

Les liaisons phosphodiester entre chaque nucléotide sont acides avec un $pK_a \sim 1,5$. A pH neutre, le groupe phosphate est donc un monoanion. En conséquence, les charges négatives se repoussent, et dans un duplex d'ADN, elles fournissent une force opposée aux interactions entre bases azotées qui maintiennent la structure secondaire en double hélice. En solution, ces charges négatives peuvent être compensées par des cations monovalents ou divalents. Ces ions contrebalancent alors les effets de répulsions électrostatiques entre phosphate et stabilisent le complexe d'ADN. Si ce squelette n'était pas chargé négativement, il serait plus difficile de déshybrider un duplex d'ADN ou d'ARN. Il faudrait donc fournir plus d'énergie pour qu'une enzyme duplique l'ADN ou le transcrive, par exemple. Cette forme anionique des acides nucléiques permet donc de faciliter les processus biologiques.

En plus de ces effets de charge, le squelette phosphate-ribose permet aux acides nucléiques un grand degré de liberté *via* les possibilités de rotations autour de simples liaisons. Plus exactement, trois types de liaisons sont impliqués dans ce phénomène (Fig 18):

- La liaison osidique qui maintient la base azotée au ribose (rotation χ) ;
- Les liaisons au sein du ribose (rotation ν_x dans le pentose, γ, ϵ en interactions avec les phosphates);

- Les liaisons qui lient le phosphate aux oxygènes, et les oxygènes aux riboses (rotations α, β, ζ).

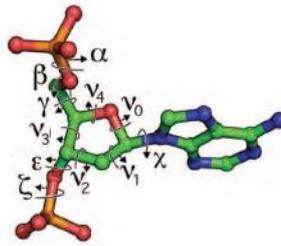


Fig 18 : Angles de torsions possibles au sein d'un nucléotide⁹⁴.
Les angles α, β, ζ sont relatifs au squelette phosphate, les rotations ν_x et χ sont relatives au ribose

Les torsions de ces liaisons permettent notamment de minimiser la répulsion des charges négatives des phosphates au sein d'un même brin ou dans un duplex.

e. Interactions guanines-phosphate

En 1986, G. Lancelot et C. Hélène¹⁰⁰ ont étudié par RMN les interactions entre l'ADN ou l'ARN avec l'anion phosphate. Ils ont ainsi montré que la guanine pouvait interagir *via* deux liaisons hydrogène avec le PO_4^- . Ils ont également déterminé que le ribose de l'ARN pouvait interagir de la même manière, tandis que le désoxyribose ne formait qu'une seule liaison (Fig 19).

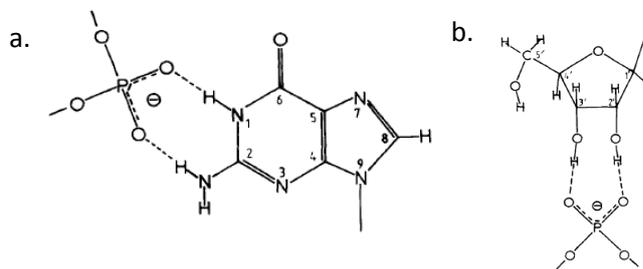


Fig 19 : a. Interactions Guanine - phosphate par 2 liaisons hydrogène
b. Interaction ribose-phosphate¹⁰⁰.

L'interaction guanine-phosphate a déjà été observée par RMN dans la formation du complexe aptamère/*L*-argininamide⁷⁷. Dans ce cas, les auteurs ont également identifié des appariements de type *Watson-Crick* et *Hoogsteen*.

f. Pseudo nœuds

Enfin, une autre structure observée dans la structuration des acides nucléiques est le pseudonœud. Cette structure se forme à partir d'une structure en tige boucle, lorsque des nucléotides de la boucle s'apparient avec une autre région de l'acide nucléique située à l'extérieur de la tige¹⁰¹ (Fig 20). Le terme de pseudonœud a été introduit car l'enlacement n'est pas un nœud au sens strict, mais en "tirant" sur les extrémités d'un pseudonœud, la structure se défait.

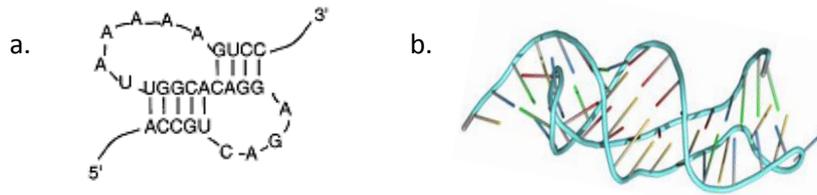


Fig 20 : Représentation Schématique en 2D (à gauche) d'un aptamère anti-biotine¹⁰² et en 3D (à droite, *PDB YMO1*) d'un pseudonoeud.

Un aptamère en série ARN en forme de pseudonœud a été identifié contre l'enzyme *Reverse Transcriptase* (transcriptase inverse) du VIH-1¹⁰³ et un aptamère anti-biotine présente également cette structure¹⁰².

g. Rôle des ions

Les acides nucléiques sont des polyanions dont les charges sont compensées en solution par la présence de cations mono et divalents¹⁰⁴. Comparés aux cations monovalents (K^+ , Na^+), les cations divalents (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) ont une plus forte affinité pour les acides nucléiques^{105,106}. Tous ces ions interviennent dans la formation des structures secondaires des acides nucléiques, mais ce sont surtout les ions divalents qui stabilisent thermodynamiquement les structures tertiaires des acides nucléiques, c'est-à-dire qui maintiennent entre elles les différentes structures secondaires coexistant dans le repliement d'un simple brin d'acide nucléique.

Les interactions entre acides nucléiques et ions peuvent être divisées en deux catégories : les interactions *Outer sphere*, où une molécule d'eau fait partie de la sphère d'hydratation du cation qui intervient dans les interactions ion-acide nucléique, et les interactions *Inner Sphere*, directement entre l'ion et l'acide nucléique (Fig 21).

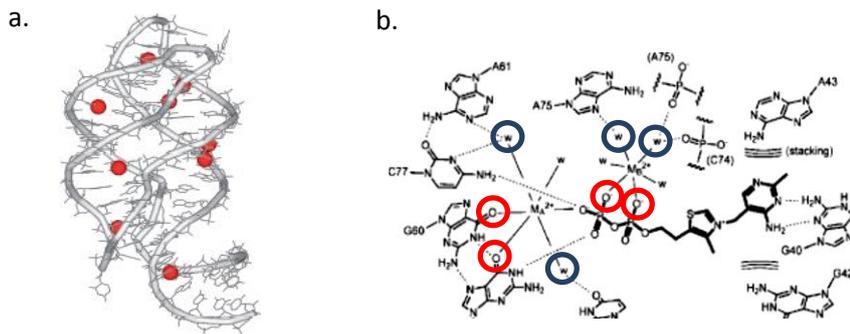


Fig 21 : a. Structure du Riboswitch à guanine¹⁰⁷, en rouge les ions Mg^{2+}
 b. Interactions *inner* (cercles rouges) et *outersphere* (cercles bleus) impliquant un ion Mg^{2+} pour la reconnaissance du TPP pour son riboswitch¹⁰⁸.

Dans le cas des aptamères et des riborégulateurs, ou riboswitch, qui sont des segments structurés dans la partie 5'-UTR (*i.e.* non codante) d'ARN messagers pouvant fixer spécifiquement un ligand, le Mg^{2+} joue souvent un rôle majeur¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Parmi les structures d'aptamère déjà déterminées, les tiges boucles et les G-quartet sont largement représentés. Les ligands interagissent avec ces structures au niveau des parties non hybridées et la complexité des repliements est à attribuer aux ions.

h. L'hypothèse du monde ARN

L'hypothèse du monde ARN est une hypothèse suivant laquelle l'acide ribonucléique serait le précurseur de toutes les macromolécules biologiques, et postule donc que l'ARN était la principale source de vie avant la première cellule à ADN. Cette théorie a été énoncée pour la première fois en ces termes par Walter Gilbert en 1986. Néanmoins, J. Watson et F. Crick suggéraient déjà en 1968 qu'il pourrait exister une relation stéréochimique entre (anti)codon et acides aminés. Ce scénario a largement été repris depuis, jusqu'à suggérer qu'une fraction du code génétique est héritée d'interactions entre ARN et acides aminés apparus aux origines de la vie¹¹⁰.

La sélection de séquences d'aptamères contre des acides aminés comprenant parfois le codon ou l'anticodon de ces acides aminés⁹ montre qu'une sélection *in vitro* des millions d'années après la fin de cet hypothétique monde ARN peut aboutir à l'identification de triplets de nucléotides complémentaires d'acides aminés qui font partie du code génétique (Fig 22). Cette observation a mené Michael Yarus à publier en 2000 un article au titre très explicite : « *RNA-ligand chemistry : a testable source for the genetic code* »¹¹¹.

Un autre exemple en faveur de la sélection naturelle de séquences d'ARN dirigées contre de petites molécules biologiques est la sélection d'un aptamère anti-ATP. Celui-ci présente un motif similaire à une séquence d'ARN viral qui reconnaît ce même ligand.

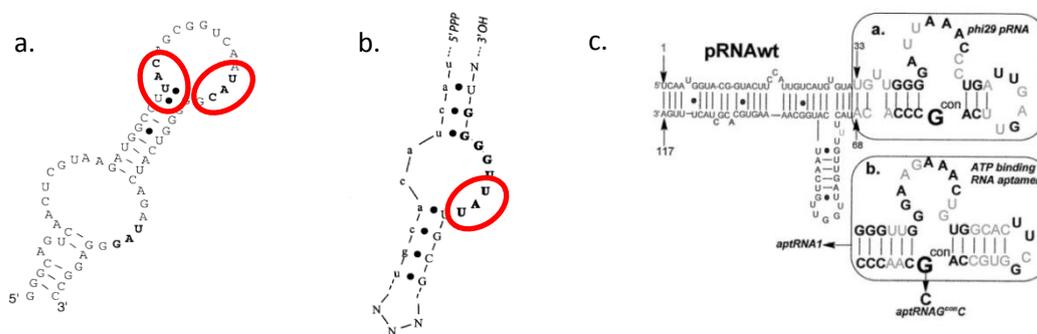


Fig 22 : a. Aptamère d'ARN anti-L-Tyrosine⁷⁶, b. Aptamère d'ARN anti-L-Isoleucine⁷⁵, dans les cercles rouge les codons respectifs
c. Comparaison des séquences d'ARN virales anti-ATP (en haut) et d'un aptamère sélectionné contre l'ATP¹¹³ (en bas)

i. Processus de reconnaissance aptamère-cible

Toutes les interactions décrites ici sont susceptibles de coexister au sein d'un brin : ces interactions se font et se défont, entraînant l'aptamère à perpétuellement passer d'une forme métastable à une autre. En solution, un aptamère est donc une molécule dynamique qui peut coexister dans différentes conformations. La diversité des fonctions chimiques susceptibles d'interagir avec un ligand associé à la diversité des formes tridimensionnelles que peut adopter un aptamère permet de

sélectionner des séquences originales par le SELEX, spécifiques voire énantiosélectives d'un ligand (Fig 23).

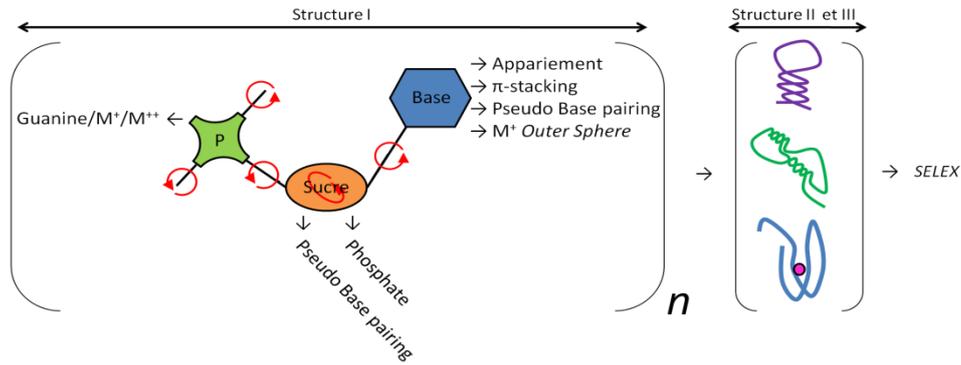


Fig 23 : Schéma récapitulatif des interactions possibles dans un aptamère et entre un aptamère et sa cible.

Beaucoup d'études sur les interactions aptamère-ligand ont été publiées, et un certain nombre d'entre elles s'est également intéressé à la cinétique de reconnaissance. Du fait de la taille de ces molécules et de la complexité du repliement, le temps caractéristique de la réaction bimoléculaire de reconnaissance peut atteindre plusieurs secondes. Deux modèles principaux sont utilisés pour décrire la cinétique du processus de reconnaissance (Fig 24) : le processus d'ajustement induit et la recherche de conformation.

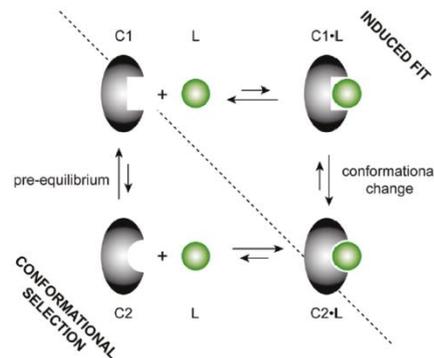


Fig 24 : Deux modèles pour la reconnaissance moléculaire: recherche de conformation et processus d'ajustement induit¹¹⁰.

Dans tous les cas, le processus est divisé en deux étapes élémentaires. Pour le modèle de recherche de conformation, l'étape impliquant une structuration *ad-hoc* de l'aptamère précède la complexation. Dans le cas du processus d'ajustement induit, l'ajustement de la conformation est postérieur à la complexation.

Pour discriminer sélectivement deux énantiomères, la littérature suggère soit de les séparer, soit d'en détecter l'un des deux, ce qui permet la mesure d'e.e. Pour ce faire, les aptamères constituent une classe de récepteurs énantiosélectifs très intéressante du fait de leur bonne affinité, leur excellente énantiosélectivité et de leur faible coût de production. Ils sont en outre aisément fonctionnalisables. L'ensemble de ces avantages confère aux aptamères une très forte potentialité pour leur intégration dans des dispositifs analytiques.

I-4- Méthodes de caractérisation d'une reconnaissance aptamère/cible et détermination d'*e.e*

a. Méthode séparative hétérogène sans marquage : la chromatographie

La chromatographie d'affinité à base d'aptamère utilise une phase stationnaire sur laquelle est greffée de façon covalente un aptamère. Lorsqu'une solution racémique de ligand traverse la colonne, l'énantiomère ayant le plus d'affinité est retenu, tandis que l'autre est élué. La molécule ayant la meilleure affinité est ensuite récupérée en utilisant une phase mobile défavorable à la reconnaissance. Cette approche permet donc potentiellement de déterminer des *e.e*.

L. McGown et son équipe ont été les premiers à utiliser des aptamères afin de séparer des acides aminés (*D*-tryptophane et *D*-tyrosine) et des énantiomères d'acides aminés¹¹⁴. La technique utilisée alors était l'électrochromatographie d'affinité (combinaison de la chromatographie liquide et de l'électrophorèse capillaire).

Généralement, la détermination d'excès énantiomérique par chromatographie liquide utilise des phases stationnaires énantiosélectives et un détecteur comme la spectroscopie UV ou de fluorescence. Des phases stationnaires non-énantiosélectives ont également été utilisées en combinant le dichroïsme circulaire comme détecteur¹¹⁵. En 2012, F. Sanchez et *al.*¹¹⁶ ont proposé de combiner ces deux approches, en utilisant une phase stationnaire énantiosélective (colonne α 1-glycoprotéine (AGP) protéine très stable de la famille des sélecteurs énantiosélectifs) et le dichroïsme circulaire comme détecteur. Grâce à cette combinaison, un excès énantiomérique de 1,5 % a pu être mesuré pour la Trimeprazine (médicament antihistaminique). Cette technique reste limitée par les performances du dichroïsme circulaire, moins bonnes que celle de la spectroscopie de fluorescence ou UV.

b. Méthode séparative homogène avec ou sans marquage : l'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique séparative basée sur la migration différentielle des solutés sous l'influence d'un champ électrique, et conduit à une discrimination suivant le rapport taille/charge des molécules. La séparation s'effectue dans des tubes de faible diamètre (25 à 75 μ m), aux bornes desquelles sont appliqués de forts voltages. La détection des molécules séparées utilise le plus souvent la spectroscopie de fluorescence. Un ligand naturellement fluorescent n'aura donc pas besoin d'être marqué. Cette technique présente l'avantage d'utiliser de très faibles volumes d'échantillons (quelques nanolitres).

Le mouvement d'un soluté chargé au travers du capillaire est la somme de deux phénomènes: l'électrophorèse (mouvement des molécules chargées vers l'électrode de polarité inverse) et l'électro-osmose (mouvement d'électrolyte lié à la charge interne du capillaire et du potentiel appliqué). Celui-ci dépend de la puissance du champ, du pH, de l'électrolyte, de la force ionique, de sa viscosité et des caractéristiques de surface du capillaire. Ces différents paramètres permettent d'optimiser la séparation.

La mobilité électrophorétique d'une molécule est proportionnelle à sa charge et inversement proportionnelle aux forces de friction qu'elle subit. Lorsque des molécules ont des charges différentes ou subissent des frictions différentes, elles se séparent durant la migration. Dans le cas de la formation d'un complexe de reconnaissance, les propriétés du ligand libre et lié seront donc différentes. Une fois complexé, le ligand acquiert en plus les propriétés de friction et de charge de son récepteur. Dans ce cas, on parle d'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE)¹¹⁷.

Cette méthode est donc pertinente pour l'étude d'interactions entre un aptamère et une petite molécule, attendu qu'un oligonucleotide est un polyanion de grande masse moléculaire. Cette technique a notamment permis le développement d'une méthodologie par compétition pour la détermination de traces d'énantiomère de la D-arginine¹¹⁸. Ainsi, il a été possible de détecter jusqu'à 0.01 % de D-arginine dans un large excès de L-arginine.

c. Méthode de détection homogène avec marquage

i. Polarisation de fluorescence

Parmi les méthodes de transduction permettant d'étudier la reconnaissance entre un aptamère et une cible en conditions homogènes, la polarisation de fluorescence est une technique performante, dans laquelle la fluorescence induite par un fluorophore change en fonction de l'interaction entre une cible et son aptamère.

L'interaction entre un fluorophore et la lumière implique une interaction entre le champ électrique associé à l'onde électromagnétique et le dipôle de transition de la molécule. Si on excite un échantillon avec de la lumière polarisée linéairement, on remarque que la fluorescence est, dans certains cas, également polarisée. Le degré de polarisation de la fluorescence est quantifié par une grandeur appelée anisotropie de fluorescence notée r . Cette mesure indique le degré de liberté d'une molécule fluorescente, vu comme la facilité avec laquelle cette molécule fluorescente tourne sur elle-même. Si, au cours d'une réaction de reconnaissance, la molécule marquée est amenée à changer ses degrés de liberté, alors le changement de polarisation de fluorescence traduira la complexation moléculaire.

Cette technique fut introduite pour la première fois pour les aptamères par J. Cryz-Aguado et G. Penner en 2008³³ en étudiant le complexe formé par l'Ochratoxine A et son aptamère. Dans cette étude, la cible était alors en compétition avec un court brin d'ADN complémentaire de l'aptamère marqué par un fluorophore. Cette stratégie compétitive est inévitable dans les cas où la sonde n'est pas intrinsèquement fluorescente ou lorsque le récepteur ne se reconfigure pas assez pour induire une variation de l'anisotropie.

En 2009, J. Ruta et E. Peyrin rapportait l'utilisation de cette technique, en marquant directement l'aptamère par un fluorophore¹¹⁹. Dans cette approche, l'aptamère anti (L)-Tyrosinamide a été modifié à une extrémité par une fluorescéine. Lors de la reconnaissance, le changement de

conformation de l'aptamère induit une augmentation de l'anisotropie de fluorescence (Fig 25), grâce à laquelle il peut être déduit la constante de dissociation du système qui confirmait celle déjà déterminée par ITC¹²⁰. Cette méthodologie a également été appliquée avec succès pour la (L)-argininamide.

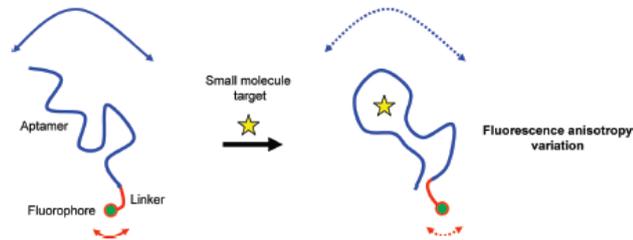


Fig 25 : Représentation schématique de la polarisation de fluorescence non compétitive. Les doubles flèches représentent les mouvements locaux et globaux contribuant à la variation d'anisotropie de fluorescence¹¹⁹.

ii. Dosage par modulation de fluorescence à base d'aptamère

Une autre stratégie, basée sur la fluorescence plutôt que sur la polarisation de fluorescence a également été décrite : les *Aptabeacon*. C'est une technique de dosage homogène qui repose sur la double modification des aptamères à leurs extrémités 5' et 3' par un fluorophore et un inhibiteur de fluorescence^{121,122}. La reconnaissance entre un aptamère et sa cible provoquera une réorganisation de l'aptamère, susceptible d'éloigner ou de rapprocher l'inhibiteur de la source de fluorescence, si bien que la présence de la cible en solution provoque un changement de fluorescence de l'aptamère. Cette stratégie repose sur un changement de conformation, mais dans le cas où la conformation de l'aptamère ne change pas suite à la reconnaissance, un dosage de type compétitif avec un troisième partenaire portant l'inhibiteur peut être utilisé¹²³.

d. Méthode de détection homogène sans marquage

i. Titration calorimétrique isotherme

La titration calorimétrique isotherme (ITC) mesure directement la chaleur émise lors de l'association entre un ligand et son récepteur. C'est une méthode de choix pour obtenir des informations thermodynamiques précises (ΔH , ΔS , K_d et la stœchiométrie).

Dans une expérience d'ITC, le ligand est titré dans une solution de récepteur sous agitation (ou inversement). L'expérience est réalisée à température constante. Après chaque ajout de ligand, la chaleur libérée ou absorbée au cours de la réaction (*i.e.* la variation d'enthalpie) est déterminée par la puissance calorifique fournie par l'appareil à la cellule de réaction pour maintenir une petite différence de température constante avec une cellule de référence. Il est donc nécessaire d'intégrer cette puissance calorifique pour obtenir la variation d'enthalpie. Quand le récepteur est saturé par le ligand, on ne mesure plus que la chaleur de dilution du ligand.

L'ITC a notamment été utilisée pour déterminer les paramètres thermodynamiques de la reconnaissance entre la L-Tyrosinamide (L-Tym) et son aptamère de 49 nucléotides¹²⁰ (Fig 26).

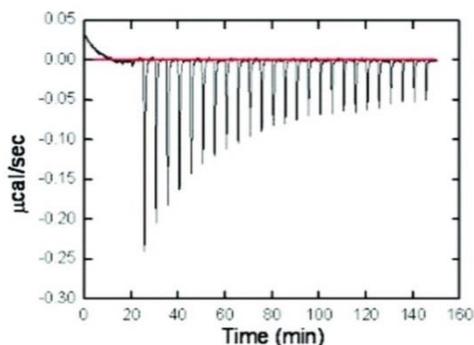


Fig 26 : Profil d'ITC obtenu pour le couple L-Tyrosinamide/Aptamère en tampon Tris base 20 mM¹²⁰, [NaCl]=150 mM, [MgCl₂]=1.5 mM, pH 7.6, à 25°C.

Les pics négatifs obtenus sur la figure 26 correspondent à la chaleur émise lors de la reconnaissance aptamère/cible. Ces pics sont intégrés pour obtenir la quantité de chaleur dégagée à chaque ajout de L-Tyrosinamide en solution. C'est en réalisant des expériences à différentes températures qu'il est possible de déterminer les paramètres thermodynamiques et stœchiométriques de la reconnaissance.

ii. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (*DC*) est une propriété physique propre aux molécules chirales. Cette propriété se traduit par l'absorption spécifique de faisceaux lumineux polarisés circulaires droits ou gauches. En conséquence, c'est une propriété exploitable pour l'étude des protéines ou acides nucléiques, faits de monomères chiraux. De plus, la structure secondaire de ces polymères peut faire apparaître des formes en hélices, qui présenteront alors des bandes de dichroïsme circulaire caractéristiques, à des longueurs d'ondes différentes. Cette technique est donc pertinente pour l'étude structurale d'aptamères, comme pour la détermination d'*e.e.*

Dans le cas d'étude sur la structuration de l'aptamère, le rôle des ions et de leur concentration¹²⁴, de la température¹²⁵ ou encore la simple présence du ligand¹²⁶ peuvent modifier le repliement de l'olignucléotide, et ainsi modifier l'intensité ou la position des pics mesurés. Bien que ces informations soient insuffisantes pour modéliser le complexe, c'est une technique idéale pour explorer les conditions optimales de reconnaissance entre un aptamère et une cible. Le plus souvent, cet outil est utilisé en complément d'autres méthodes comme la RMN¹²⁷ ou l'ITC^{120, 128, 129}.

Pour la détermination d'*e.e.*, le dichroïsme circulaire est le plus souvent associé à une chromatographie d'affinité : il sert de détecteur en sortie de colonne, ce qui permet d'identifier les énantiomères.

iii. Résonance Magnétique Nucléaire

Les aptamères sont des molécules extrêmement complexes de par le nombre d'interactions intramoléculaires imposées par la séquence primaire, les ions et d'éventuels ligands. De ce fait, leurs repliements sont difficilement accessibles, si ce n'est par les méthodes de cristallographie ou de RMN. Cette dernière approche a permis de résoudre de nombreuses structures aptamères/cibles, et même d'identifier les bases clés pour la reconnaissance et la structuration du complexe¹³⁰⁻¹³².

La RMN permet également de déterminer des *e.e*. Bien que cette technique ne donne pas accès directement à la configuration absolue d'un centre chiral, elle permet de déduire cette propriété à l'aide d'un agent chiral. En effet, deux énantiomères ont le même spectre RMN. En revanche, ce n'est pas le cas de deux stéréoisomères. Ainsi, en couplant la cible avec un agent chiral, il est possible de remonter à l'*e.e* à partir de la signature RMN du diastéréoisomère correspondant. L'utilisation d'un agent chiral (énantiomériquement pur) interagissant de façon non énantiosélectif permet donc de distinguer deux énantiomères par RMN.

Le premier exemple d'utilisation d'agent chiraux en RMN date de 1969 par Harry S. Mosher¹³³, qui donnera son nom à l'acide α -méthoxy- α -trifluorométhylphénylacétique (MTPA, ou acide de Mosher). Cet acide à un carbone assymétrique réagit avec les fonctions alcools ou amines pour former un ester ou une amide. Leur configuration absolue est ensuite déterminée par analyse des spectres RMN. Cette stratégie permet de détecter jusqu'à 1 % d'*e.e*¹³⁴.

Un autre agent de discrimination chirale utilisable en RMN est l'alcool de Pirkle¹³⁵, qui forme des composés diastéréoisomériques de courte durée de vie.

I-5- Biocapteurs à base d'aptamère : l'aptacapteur

Une application analytique prometteuse pour les aptamères est le biocapteur, et parfois appelé aptacapteur. Un aptacapteur est fait d'une interface sur laquelle est immobilisée l'aptamère, et lorsque le ligand est mis en présence de cette surface modifiée, il y a reconnaissance moléculaire (Fig 27). La difficulté est de trouver une façon de détecter la formation du complexe. Pour y parvenir, plusieurs stratégies ont déjà été explorées, avec ou sans marquage.

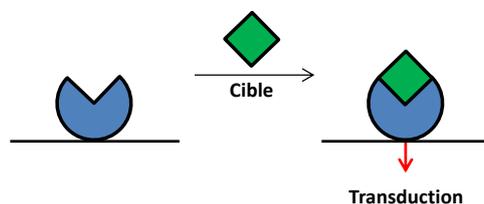
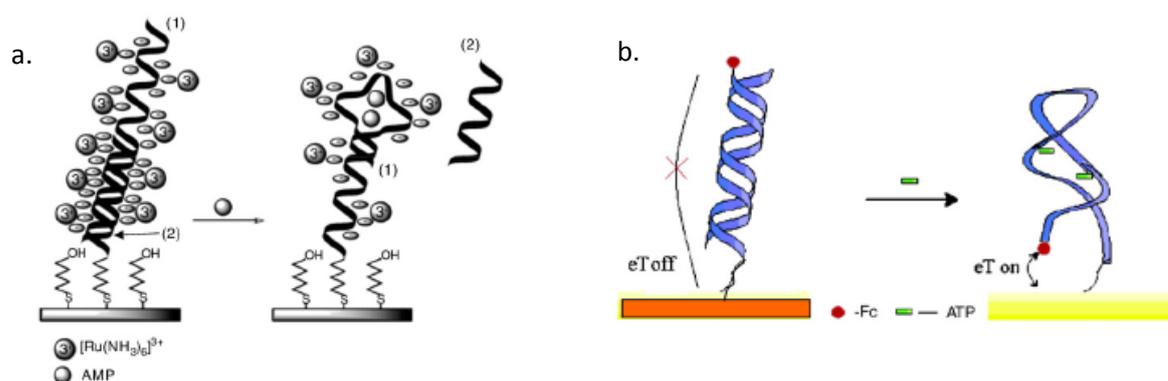


Fig 27 : Représentation schématique du fonctionnement d'un aptacapteur

a. Aptacpteurs avec marquage

i. L'aptacpteur électrochimique

L'électrochimie dispose de nombreux avantages : c'est un moyen de détection simple d'utilisation, sensible, à un coût de fonctionnement peu élevé, facilement transportable et compatible avec des analyses de fluides biologiques. Pour la transduction électrochimique, deux stratégies se distinguent nettement¹³⁶ dans la littérature. La première repose sur l'utilisation de trois partenaires pour la détection. Le plus souvent cette approche utilise le brin complémentaire de l'aptamère, si bien que le ligand est en compétition avec ce brin. Une stratégie intéressante ne nécessitant aucun marquage a été rapportée en 2007¹³⁷, via l'utilisation de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ associée à la chronocoulométrie. Cette combinaison avait déjà été utilisée par M. Tarlov¹³⁸ pour déterminer la concentration surfacique d'ADN greffé à la surface d'une électrode. Le principe de cet aptacpteur dirigé contre l'adénosine monophosphate (AMP) est schématisé figure 28.a. Dans ce cas, l'aptamère anti-AMP est greffé en surface avec une courte séquence complémentaire, qui permet un écrantage des charges par le ruthénium. La quantité de ruthénium est alors dosée par électrochimie. La reconnaissance moléculaire entre la cible et l'aptamère provoque la dissociation du brin complémentaire et un changement significatif du nombre de ruthéniums en surface. La chronocoulométrie permet alors de faire la différence de quantité de charges en surface avant et après la reconnaissance et de détecter une reconnaissance à 10^{-7} M de cible en solution. Cette approche est toutefois délicate à étendre car en règle générale, l'affinité dépend de la nature et de la quantité d'ions du tampon. Ici, ceux-ci sont en très faible quantité pour garantir que seuls les ions Ru^{2+} sont associés aux aptamères.



Un autre exemple, qui cette fois nécessite un marquage avec une sonde rédox sur l'aptamère, est un capteur à ATP¹³⁹ (Fig 28.b). Dans ce cas, l'aptamère marqué est greffé sur une surface et hybridé avec un brin complémentaire. La structure en double hélice éloigne la fonction redox de l'électrode, empêchant tout échange électronique. Lorsque la cible est en solution, la reconnaissance moléculaire entraîne la dissociation du duplex et l'aptamère adopte alors une conformation tertiaire qui rapproche le centre rédox de la surface et autorise les échanges d'électrons avec l'électrode. On

parle dans ce cas d'un aptacapteur de type « signal on », puisque la présence de la cible augmente le signal électrochimique. Cet aptacapteur permet des détections d'ATP de l'ordre du nM en solution.

La deuxième stratégie pour traduire une reconnaissance moléculaire à la surface d'une électrode repose sur le changement de repliement de l'aptamère qui, en fonction de la présence du ligand, permet à une sonde électrochimique d'échanger des électrons avec l'électrode. K. Plaxco a largement contribué au développement de cette catégorie d'aptacapteur¹⁴⁰⁻¹⁴². La figure 29 représente deux types de capteur à changement de configuration : l'un sert à détecter la cocaïne et est de type « signal on », l'autre sert à détecter la thrombine et est de type « signal off ». Ces aptacapteurs ont des seuils de sensibilité au μM et au nM respectivement. L'aptacapteur à cocaïne est même 200 fois plus sensible que le test de Scott habituellement utilisé.

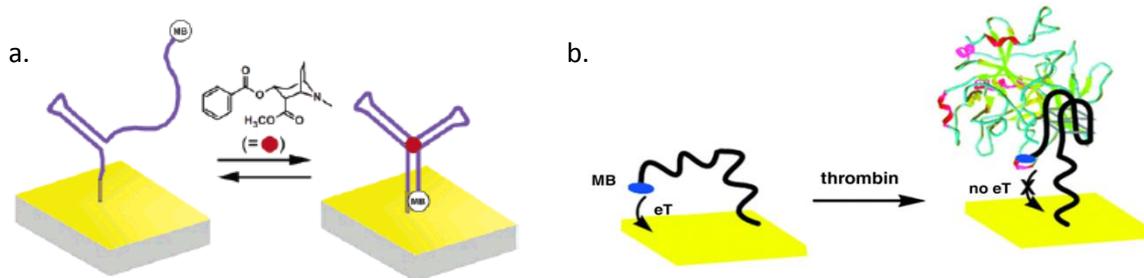


Fig 29 : Représentation schématique des aptacapteurs à a. cocaïne¹⁴⁰ et b. thrombine développés par Plaxco¹⁴¹.

Pour la conception de ses capteurs, K. Plaxco utilise le bleu de méthylène comme marqueur électrochimique, qui présente l'avantage d'être électroactif à des potentiels cathodiques. Cette propriété est très intéressante dans le cadre de tests d'échantillons d'origine biologique riches en protéines et en métabolites organiques susceptibles d'être oxydés à l'électrode. Ainsi, l'aptacapteur à cocaïne¹⁴⁰ est capable de détecter 500 μM de cible dans de la salive ou du sérum de veau fœtal à 50%.

Certains aptacapteurs électrochimiques ont un fort potentiel pour des applications en diagnostics cliniques¹⁴³ notamment pour la détection de thrombine¹⁴⁴, d'IgE¹⁴⁵ et d'interféron γ ¹⁴⁶. Cette méthode de transduction n'est cependant pas la seule : on distingue également l'utilisation de la fluorescence (notamment pour la détection de la thrombine^{147,148}), avec des seuils de détection similaires à l'électrochimie de l'ordre du nM.

ii. L'aptacapteur à fluorescence

Dans ce type d'aptacapteur, l'interaction entre une cible et son aptamère se traduit par une émission de fluorescence. Le premier aptacapteur à fluorescence a été utilisé pour la détection de la *L*-adénosine par immobilisation d'un aptamère ARN biotinylé spécifique de la cible à la surface d'une fibre optique fonctionnalisée par la streptavidine¹⁴⁹. Ce capteur a permis de mesurer les constantes d'interaction entre la *L*-adénosine marquée par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et son

aptamère ($k_a = 2200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $k_d = 0,01 \text{ s}^{-1}$). Ainsi, le dosage compétitif entre la *L*-adénosine et la *L*-adénosine-FITC permet d'atteindre un seuil de détection de l'ordre du μM .

Un autre « *design* » de capteur fluorescent pour la détection directe de la thrombine utilise la polarisation de fluorescence¹⁵⁰. Dans cette approche, c'est l'aptamère fixé sur une lame de verre qui est marqué par le FITC. L'anisotropie de fluorescence est utilisée pour détecter la fixation du ligand. En effet, de cette reconnaissance résulte une augmentation de la taille de la couche qui conduit à une modification de la vitesse de diffusion rotationnelle et donc de l'anisotropie de fluorescence. Cette essai est rapide (<10 min) et sensible (limite de détection à 5 nM).

b. Aptacapteurs sans marquage

i. Résonance Plasmonique de Surface

La résonance plasmon de surface (*RPS*) est une technique permettant de détecter la liaison d'un ligand sur son récepteur immobilisé à la surface d'une couche métallique, en général de l'or. Le système de détection est basé sur un changement d'indice de réfraction quand le ligand se lie à son récepteur. Le plasmon de surface est une oscillation d'un quantum de densité d'électron très délocalisé à l'interface entre un métal et un diélectrique. La résultante de ces oscillations est une onde électromagnétique évanescente qui se propage à l'interface. La fréquence de cette onde dépend de l'indice optique du diélectrique, c'est-à-dire de la quantité de matière présente à l'interface. En pratique, pour un angle incident et une longueur d'onde définie, l'illumination d'une surface métallique va créer une onde évanescente qui entre en résonance avec l'onde électromagnétique du plasmon de surface. En conséquence, l'absorption de cette énergie photonique réduira l'intensité du rayon lumineux réfléchi. Lorsqu'une espèce biologique vient interagir à l'interface métal-diélectrique, l'énergie nécessaire pour exciter les plasmons de surface change également. Pour une longueur d'onde fixe, l'angle incident change, ou inversement. Enfin, à angle incident et longueur d'onde fixe, l'intensité lumineuse changera. Ces trois principes sont respectivement exploités par les dispositifs Biacore, les spectrophotomètres à réflexion et l'imagerie SPR.

Cette technologie a été utilisée pour le développement d'aptacapteurs pour la détection de la protéine RBP4¹⁵¹ (marqueur du diabète de type 2) et du virus H5N1 (virus de la grippe aviaire)¹⁵².

ii. Microbalance à Quartz

La microbalance à quartz est une autre technique hétérogène ne nécessitant pas de marquage d'un des éléments de reconnaissance. Le principe est basé sur la perturbation des conditions aux limites d'un résonateur : le quartz. Ce matériau possède des propriétés piézoélectriques qui lui permettent de vibrer lorsqu'il est soumis à un champ électrique alternatif, et de générer ainsi une onde acoustique. La fréquence de vibration du quartz dépend de son épaisseur, et le dépôt à la surface d'un quartz d'une couche organique peut être considéré comme une extension du quartz (modèle de Sauerbrey). Toute modification en surface, comme une reconnaissance moléculaire, est donc

susceptible de faire varier l'épaisseur de cette couche organique et donc la fréquence de résonance du quartz. En analysant les variations de fréquence de résonance en fonction de la quantité de cible en présence, il est possible d'établir des courbes de calibrations et donc d'effectuer des dosages. Cette technique a permis le développement d'un aptacapteur pour la détection d'IgE¹⁵³.

I-6- Conclusion

De nombreux efforts sont consacrés à la mise au point de systèmes permettant la détermination d'*e.e.*

L'utilisation des aptamères a fait ses preuves en permettant de mesurer un *e.e.* de 0,01 %¹¹⁸ par électrophorèse capillaire d'affinité. Par ailleurs, de nombreux systèmes de détection hétérogènes à base d'aptamères ont été développés. Cependant, il est notoire que l'affinité des récepteurs subit une forte diminution une fois immobilisé. Au regard des constantes d'affinité des aptamères dirigés vers des molécules de faible poids moléculaire, *i.e.* dans la gamme du μM , il semble donc plus raisonnable de privilégier une approche homogène.

Alors que l'électrochimie dispose d'avantages reconnus, il n'existe qu'un seul exemple de son utilisation en configuration homogène qui présente de surcroît une sensibilité (insuffisante) de l'ordre du pourcent³⁶.

L'objectif de ce travail est donc en premier lieu de combiner les avantages de l'électrochimie à ceux des aptamères pour la réalisation de systèmes de mesure d'*e.e.* en phase homogène.