

Mesure d'excès énantiomérique par électrochimie en utilisant l'énantiosélectivité des aptamères

II-1- le modèle *L-Tym/D-Apta*₄₉

Electrochemical Aptamer-Based Binding Assay for Trace Detection of Chiral Compounds ¹⁵⁴.
Dans ce chapitre est exposée la mise au point d'un nouveau principe de détection électrochimique d'une reconnaissance chirale en phase homogène d'une cible par son aptamère. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Anal. Chem.* en 2012 intitulée « Simple and Highly Enantioselective ».

Dans ce travail, la présence d'une cible chirale en solution est détectée par électrochimie. En présence de son aptamère, un équilibre s'établit entre la forme libre et liée de la cible. Du fait de la grande dimension de l'aptamère devant celle de la cible, le complexe ligand/récepteur diffusera moins vite que le ligand seul (Fig 30). Ainsi, les courants mesurés dépendront des quantités de cible libres et liées.

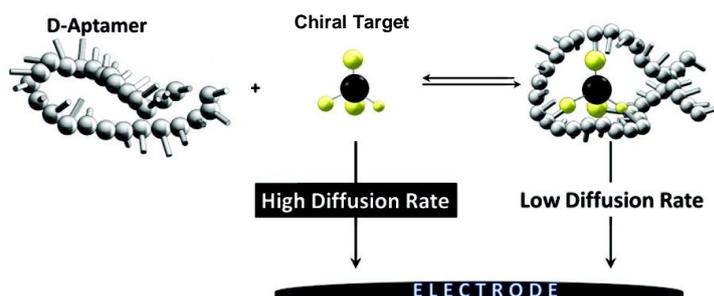


Fig 30 : Principe général de détection homogène d'une reconnaissance Aptamère/Cible par électrochimie

Cette stratégie a l'avantage de reposer sur un principe de détection indépendant d'une reconfiguration de l'aptamère lors de la reconnaissance moléculaire.

b. Choix de la cible

Pour valider ce principe de détection, l'aptamère sélectionné contre la *L-Tyrosinamide* (*L-Tym*, fig 32.a) a été utilisé car ce système a deux avantages. Le premier est une affinité de l'ordre du μM ^{118, 119} qui permet déjà d'envisager une moindre consommation en réactif, et le second est que l'aptamère en série (*D*) présente une très bonne énantiosélectivité¹¹⁸. Les conditions de reconnaissance optimales ont été déterminées en tampon tris 5 mM à pH 7,4, NaCl à 50 mM et MgCl₂ à 10 mM. C'est avec ce tampon que toutes les expériences ont été réalisées. La séquence de 49 nucléotides anti-*L-Tym* sera désignée *D-Apta*₄₉ (5'-AATTCGCTAGCTGGAGCTTGGATTGA TGTGGTGTGTGAGTGC GG TGCC-3'). Le protocole de titrage des solutions d'aptamère est détaillé dans la partie matériels et méthode (cf. p108).

Tous les voltammogrammes ont été réalisés avec une vitesse de balayage de 50 mV.s⁻¹.

c. Dispositif expérimental

Les mesures électrochimiques ont été réalisées à l'aide de cellules électrochimiques miniaturisées à usage unique obtenues par sérigraphie au laboratoire. Ces cellules à trois électrodes réunissent sur une petite surface plane une pseudo-électrode de référence Ag/AgCl, une contre électrode et une électrode de travail de $0,07 \text{ cm}^2$ en carbone (Fig 31). Ces électrodes sont successivement déposées à l'aide d'encre d'argent et de carbone et séchées à 120°C pendant 15 min (cf matériels et méthodes p109). L'encre de carbone est constituée d'un mélange de polymère et de fragments micrométriques de carbone qui réticulent durant le séchage. Au terme de cette fabrication, un espace de travail de $0,2 \text{ cm}^2$ regroupant ces trois électrodes est délimité en utilisant une couche diélectrique hydrophobe.

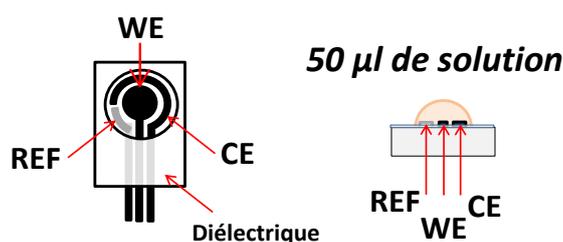


Fig 31 : Dispositif expérimental d'électrodes sérigraphiées : **WE** : Electrode de Travail, $S = 0,07 \text{ cm}^2$, **CE** : Contre Electrode, **REF** : électrode de Référence.

L'utilisation de ces électrodes présente 3 avantages :

- Le matériel est jetable, il n'y a donc pas besoin de régénérer l'électrode de travail par polissage;
- Du fait de l'inclusion de carbone dans une matrice polymère, le courant capacitif mesuré est faible ;
- La taille réduite de ce système à trois électrodes entouré d'une matrice hydrophobe restreint la surface occupée par le solvant ce qui permet de travailler dans des microvolumes ($\sim 50 \mu\text{l}$) et donc d'être peu consommateur en matériel biologique.

d. Détection électrochimique de la L-Tyrosinamide

L'électroactivité de la fonction phénol de la L-Tym (Fig 32.a) a été utilisée dans un premier temps pour le suivi de la reconnaissance.

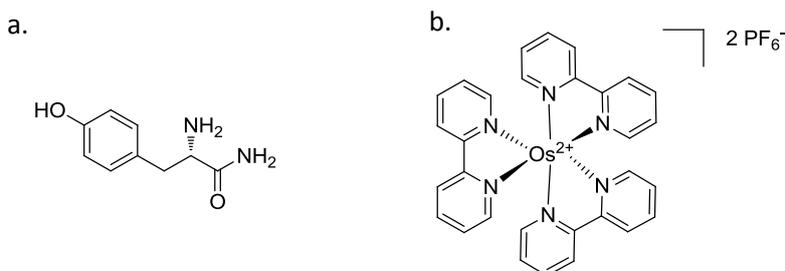


Fig 32 : a. L-Tyrosinamide (L-Tym) ; b. $[\text{Os}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$

La figure 33.a présente le comportement électrochimique de la *L*-Tym en solution. L'oxydation du phénol débute vers $E = 0.48 \text{ V vs Ag/AgCl}$ selon un processus d'oxydation irréversible. Cette réaction produit des radicaux cations phénoxyls, qui en milieu aqueux se déprotonnent très rapidement pour donner des espèces extrêmement réactives pouvant dimériser, voire polymériser. Ce processus est généralement à l'origine d'une passivation de l'électrode, caractérisée ici par un décalage anodique du pic d'oxydation de la *L*-Tym et une diminution du courant en fonction du nombre de balayages successifs.

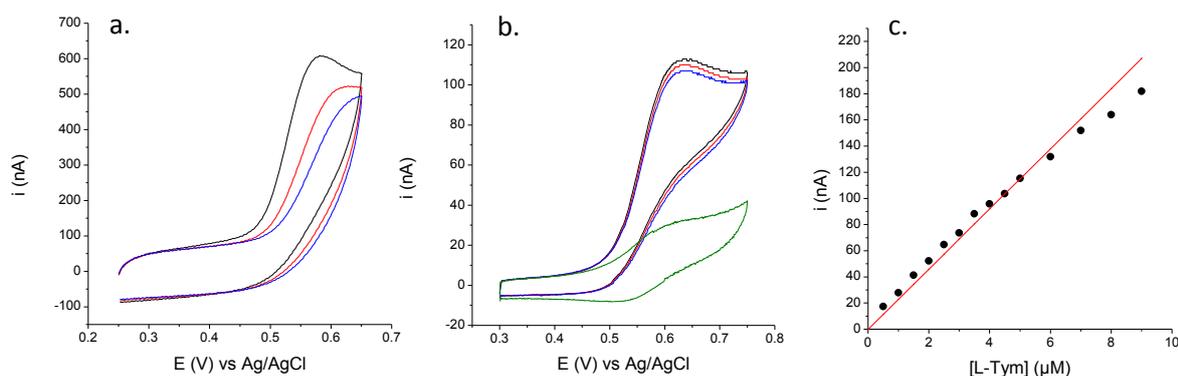
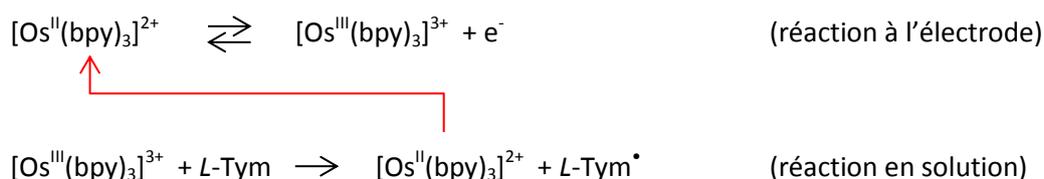


Fig 33 : a. Voltammogrammes d'une solution de *L*-Tym à $20 \mu\text{M}$; b. Voltammogrammes d'une solution de *L*-Tym à $5 \mu\text{M}$ en présence d' $[\text{Os}^{\text{III}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ à $1 \mu\text{M}$; cycle 1 ; cycle 10 ; cycle 20 ; $[\text{Os}^{\text{III}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ seul. $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, température ambiante. c. Variation de l'intensité de pic en fonction de la concentration en *L*-Tym

Ce problème de passivation, à l'origine d'une mauvaise reproductibilité des mesures, peut être évité via l'oxydation catalytique du phénol¹⁵⁵ par l'intermédiaire d'un complexe d'osmium (Fig 32.b) jouant alors le rôle de médiateur redox ($[\text{Os}^{\text{III}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$, $E^\circ = 0,58 \text{ V vs Ag/AgCl}$), selon le schéma réactionnel suivant :



Comme l'illustre la figure 33.b, un courant de pic catalytique très bien défini peut ainsi être obtenu ($E = 0,62 \text{ V vs Ag/AgCl}$) avec une bonne reproductibilité. Les intensités de pic de catalyse (i_p) sont linéaires en fonction de la concentration en *L*-Tym dans une gamme de $0,5$ à $9 \mu\text{M}$, en présence de $1 \mu\text{M}$ d' $[\text{Os}^{\text{III}}(\text{bpy})_3]^{3+}$ (fig 33.c). La forme du pic et la linéarité des courants de pic avec la concentration en *L*-Tym sont des éléments indiquant que la catalyse est rapide et que le phénomène est contrôlé par la diffusion de la *L*-Tym vers l'électrode. Il s'agit d'un régime dit de « catalyse totale », exclusivement limité par la vitesse de transport de la molécule catalysée dont l'intensité de pic (i_p^0) peut être décrite par l'équation suivante (Annexe I p129):

$$i_p^0 = 0,609nFSC_T^0 \sqrt{D_T} \sqrt{\frac{Fv}{RT}} = \alpha C_T^0 \quad (1)$$

Avec n le nombre d'électrons impliqués dans la réaction catalytique, F la constante de Faraday, S la surface de l'électrode (cm^2), D_T le coefficient de diffusion de la L -Tym ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), et C_T^0 la concentration initiale en L -Tym ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

e. Discrimination L -Tym/[L -Tym. D -Apta₄₉] :

Afin de pouvoir observer la complexation de la cible avec l'aptamère, celle-ci doit engendrer une variation spécifique du signal électrochimique dans le régime de catalyse utilisé.

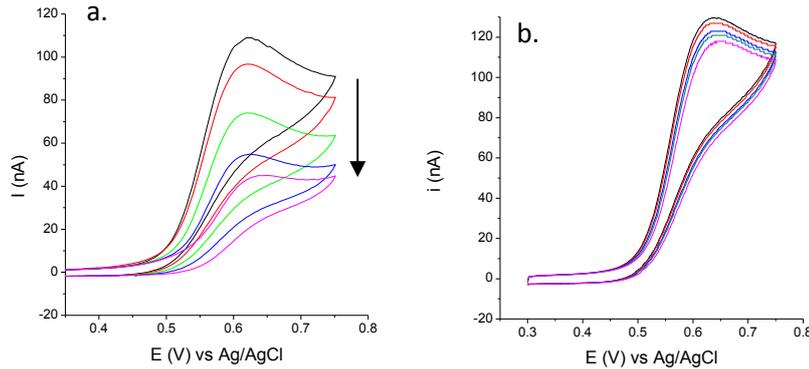


Fig 34 : a. Voltammogrammes d'une solution de L -Tym $5 \mu\text{M}$, $[\text{Os}^{\text{III/II}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ à $1 \mu\text{M}$, $[D\text{-Apta}_{49}] = 0, 2, 5, 10, 20 \mu\text{M}$
 b. Voltammogrammes d'une solution de L -Tym $5 \mu\text{M}$, $[\text{Os}^{\text{III/II}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ à $1 \mu\text{M}$, $[D\text{-Aléa}_{49}] = 0, 2, 5, 10, 20 \mu\text{M}$
 $v = 50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, température ambiante.

Comme présenté sur la figure 34.a, lorsque des quantités croissantes de D -Apta₄₉ sont introduites dans une solution de L -Tym à $5 \mu\text{M}$ (cf matériels et méthodes p110), une diminution de l'intensité de pic de catalyse est observée. Cette chute est spécifique de la séquence d'aptamère utilisée, puisque lorsque l'aptamère est une séquence aléatoire (D -Aléa₄₉) le signal catalytique ne décroît pas.

Les variations de signaux observées (fig 34.a) proviennent d'un abaissement du coefficient de diffusion de la cible lorsqu'elle se lie à l'aptamère. Compte tenu de la taille de l'aptamère devant celle de la L -Tym et de la forme inchangée des pics de catalyse sur toute la gamme de D -Apta₄₉, il est raisonnable de faire l'hypothèse que le régime de catalyse ne change pas lorsque l'aptamère est complexé à la cible. C'est donc la différence de coefficient de diffusion qui est à l'origine de cette chute du signal. Pour de fortes concentrations en aptamère, toutes les L -Tym peuvent être considérées comme liées à l'aptamère et l'équation (1) s'écrit alors :

$$i_p^\infty = 0,609nFSC_T^0 \sqrt{D_{AT}} \sqrt{\frac{Fv}{RT}} = \beta C_T^0 \quad (2)$$

Où i_p^∞ représente l'intensité du pic de catalyse mesuré pour une concentration très grande en aptamère devant celle en L -Tym, et D_{AT} est le coefficient de diffusion du complexe L -Tym/ D -Apta₄₉.

Lorsque le D -Apta₄₉ est introduit dans une solution de L -Tym, il s'établit un équilibre caractérisé par une constante de dissociation K_d . Ainsi, en considérant une stoechiométrie 1:1 :



Lorsque cet équilibre est atteint, le courant mesuré est donc une combinaison linéaire des courants relatifs aux formes libre et liée de la *L*-Tym. D'après (1) et (2):

$$i_p = \alpha C_T + \beta C_{AT} \quad (4)$$

$$\text{Avec } C_T + C_{AT} = C_T^0$$

Où C_T est la concentration en *L*-Tym libre et C_{AT} est la concentration en complexe *L*-Tym/*D*-Apta₄₉. En normalisant par l'intensité du courant de pic de catalyse de départ (i_p^0), c'est-à-dire sans aptamère en solution, on obtient :

$$\frac{i_p}{i_p^0} = \frac{C_T}{C_T^0} + \frac{\beta C_{AT}}{\alpha C_T^0} \quad (5)$$

En définissant la fraction de *L*-Tym libre en solution:

$$\chi_L = \frac{C_T}{C_T^0} = \frac{C_T^0 - C_{AT}}{C_T^0} \quad (6)$$

L'équation (5) se réécrit de la façon suivante :

$$\frac{i_p}{i_p^0} = \chi_L + (1 - \chi_L) \frac{i_p^\infty}{i_p^0} \quad (7)$$

L'équation (7) est alors générale pour la description d'une variation de courant due à une modification de vitesse de diffusion d'une sonde électrochimique en solution.

Pour que l'équation (7) soit valide, il faut s'assurer que le temps d'observation expérimental soit plus court que la dynamique de l'équilibre. Dans le cas de la voltammétrie cyclique et dans les conditions expérimentales choisies (*i.e.* $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$), le temps caractéristique est défini par $\tau = \frac{RT}{Fv} = 0,5 \text{ s}$, ce qui représente la période d'observation. Dans la littérature, les cinétiques de dissociation pour des couples cibles/aptamères ont déjà été mesurées¹⁵⁶, et sont de l'ordre de $10^{-2}/10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Ces valeurs signifient que 63 % de la population de complexe s'est dissocié entre 100 et 1000 s. La fenêtre d'observation étant 200 à 2000 fois plus faible, il en est déduit que l'équilibre sondé peut être considéré comme statique pendant la mesure, c'est-à-dire qu'aucune formation ou dissociation du complexe ne s'opère pendant la mesure électrochimique. Ainsi, l'expérience peut être schématisée par la figure 35.a.

Les variations de courant à l'équilibre, après chaque ajout d'aptamère, peuvent être utilisées pour déterminer la constante d'équilibre du processus de reconnaissance. Sur la figure 35.b est

représentée la variation de l'intensité de courant normalisée, en fonction de la concentration en aptamère (points noirs).

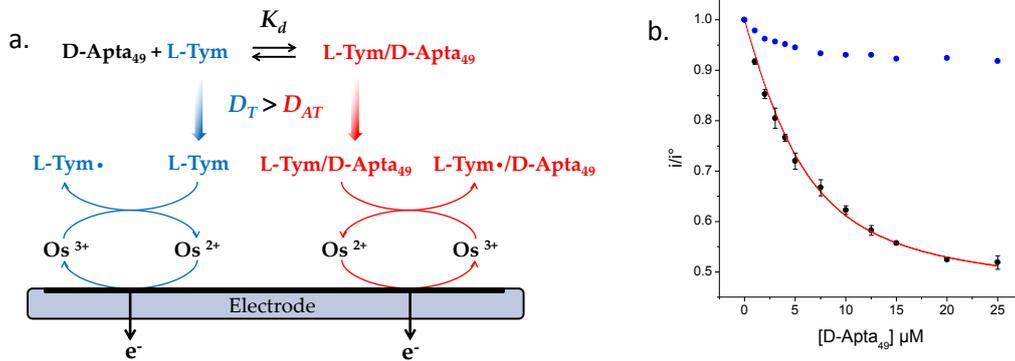


Fig 35 : a. Représentation schématique du processus de détection de la L-Tym en présence de D-Apta₄₉
 b. Représentation graphique $i/i^\circ = f([aptamère])$ pour des ajouts de D-Apta₄₉ (n = 3) et D-Aléa₄₉

D'après l'équation (3), la constante de dissociation s'exprime de la manière suivante:

$$K_d = \frac{C_T \cdot C_A}{C_{AT}} = \frac{(C_T^0 - x)(C_A^0 - x)}{x} \Leftrightarrow x^2 - x(K_d + C_T^0 + C_A^0) + C_T^0 C_A^0 = 0 \quad (8)$$

$$\Delta = (K_d + C_T^0 + C_A^0)^2 - 4C_T^0 C_A^0$$

Où C_A^0 est la concentration totale en aptamère, et x l'avancement de réaction. Le polynôme (8) présente 2 solutions mais une seule est physiquement acceptable :

$$x = C_{AT} = \frac{K_d + C_T^0 + C_A^0 - \sqrt{\Delta}}{2} \quad (9)$$

L'équation (7) se réécrit alors :

$$\frac{i_p}{i_p^0} = 1 - \frac{K_d + C_T^0 + C_A^0 - \sqrt{\Delta}}{2C_T^0} \left(1 - \frac{i_p^\infty}{i_p^0}\right) \quad (10)$$

Grâce à cette équation, il est possible de faire un ajustement non linéaire des résultats représentés figure 35.b, et d'en extraire le K_d ainsi que i_p^∞ / i_p^0 . La valeur de $K_d = 2,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ obtenue est en très bon accord avec celles déterminées par d'autres techniques comme la polarisation de fluorescence ($1,7-2,2 \mu\text{M}$)¹¹⁸ et l'ITC ($1,8-3,2 \mu\text{M}$)¹¹⁹.

Du rapport $i_p^\infty / i_p^0 = 0,45 \pm 0,01$, il est possible d'exprimer le rapport des coefficients de diffusion $D_{AT} / D_T = 0,2$ (équation (1) et (2)). Dans la littérature¹⁵⁷, les coefficients de diffusion d'acides aminés ont été évalués entre 3 et $10 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Une étude sur la diffusion de simples brins d'ADN rapporte que le coefficient de diffusion varie linéairement avec le nombre de nucléotides¹⁵⁸. Sur la base de ces résultats, un aptamère de 49 nucléotides aurait un $D_{49nt} = 0,9 \times 10^{-6} \pm 0,1 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. D'après ces études, le rapport des coefficients de diffusion de ces espèces doit être entre 0,1 et 0,3, et le

rapport i_p^∞/i_p^0 entre 0,32 et 0,55, à température ambiante. Les résultats présentés ici sont donc en accord avec ces données.

f. Spécificité

Afin d'examiner la spécificité de l'aptamère pour sa cible, les mêmes expériences ont été réalisées avec des analogues structuraux de la *L*-Tym : la *L*-Tyrosine (*L*-Tyr) qui possède une fonction acide à la place de l'amide, le paracétamol, et le 3-(4-hydroxyphényl)propanamide qui n'est pas chiral mais qui conserve la fonction amide (Fig 36).

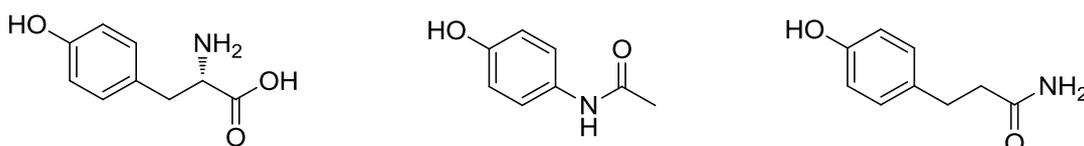


Fig 36 : de gauche à droite : *L*-tyrosine, Paracétamol et 3-(4-hydroxyphényl)propanamide.

Ces trois molécules présentent une fonction phénol pouvant être oxydée catalytiquement par le complexe d'osmium (III). Le même protocole expérimental de détermination du K_d a pu être appliqué (Fig 37).

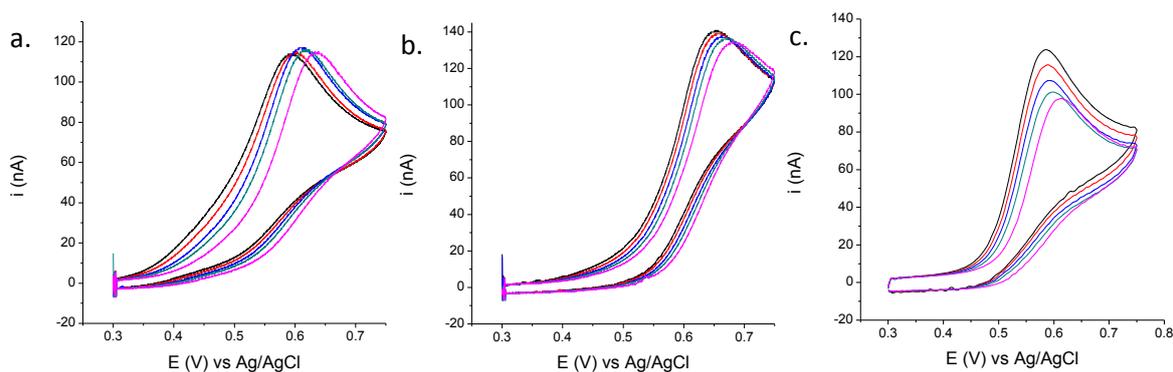


Fig 37 : Voltammogrammes de solutions d'analogues à 5 μ M, $[\text{Os}^{\text{III/II}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ à 1 μ M, $[\text{D-Apta}_{49}] = 0, 2, 5, 10, 20 \mu\text{M}$
a. *L*-Tyrosine, b. Paracétamol, c. 3-(4-hydroxyphényl)propanamide, $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, température ambiante.

D'après les résultats présentés figure 38.a, on remarque que la légère diminution de courant de catalyse observée pour la *L*-Tyrosine et le paracétamol lors de l'ajout d'aptamère sont du même ordre de grandeur que celles observées pour la *L*-Tym en présence du brin *D*-Aléa₄₉.

Ces légères chutes de courant pourraient être dues à des interactions non spécifiques. Afin de s'en assurer, les mêmes expériences ont été réalisées en présence d'un excès d'ADN de 49 adénosines à 100 μ M (*D*-Poly-A₄₉). Un témoin avec ajout de tampon sans aptamère est également nécessaire, afin de définir la ligne de base de ces expériences (Fig 38.b).

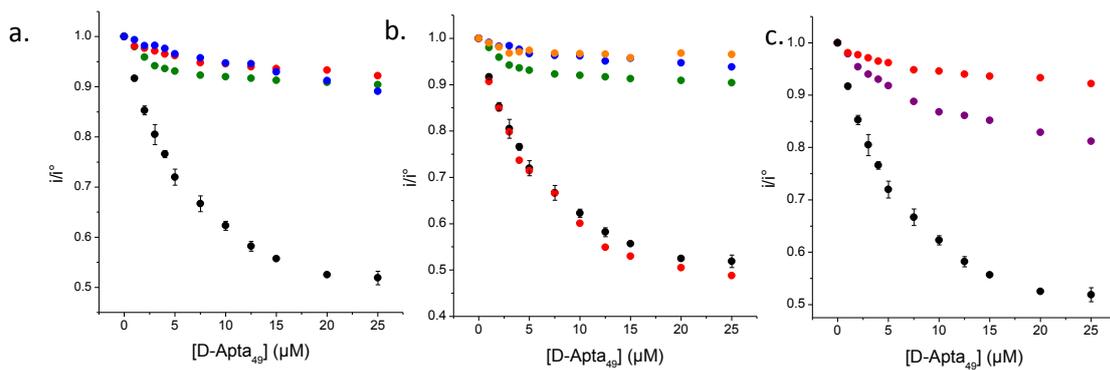


Fig 38 : a. Représentation graphique $i/i^\circ = f([D-Apta_{49}])$ pour la *L-Tym* ($n = 3$), la *L-Tyrosine*, le paracétamol et le brin *D-Aléa₄₉* ;
 b. Représentation graphique $i/i^\circ = f([D-Apta_{49}])$ pour la *L-Tym* ($n = 3$), *L-Tym en présence de 100 μM de D-PolyA₄₉*,
 la *L-Tyrosine*, *L-Tyrosine en présence de 100 μM de L-PolyA*, et la *L-Tym sans ajout d'aptamère*.
 c. Représentation graphique $i/i^\circ = f([D-Apta_{49}])$ pour la *L-Tym* ($n = 3$), le 3-(4-hydroxyphényl)propanamide et le brin *D-Aléa₄₉* ;

D'une part, la présence de 100 μM de *D-Poly-A₄₉* ne modifie pas les variations de courant observées pour la reconnaissance de la *L-Tym* (Fig 38.b), ce qui confirme la spécificité de la séquence de l'aptamère vis-à-vis de cette molécule.

D'autre part, la variation de signal obtenue pour la *L-Tyr* en présence de *D-Poly-A₄₉* suit la variation mesurée pour un simple ajout de tampon (Fig 38.b). D'après les différences entre les résultats en vert et bleu sur la figure 38.b, il y a donc bien des interactions non spécifiques entre les analogues et l'ADN introduit en solution. La *L-Tyrosine* et le Paracétamol ne sont donc pas reconnus par l'aptamère anti-*L-Tym*.

La variation de courant en fonction de la concentration en aptamère obtenue pour le 3-(4-hydroxyphényl)propanamide (Fig 38.c) montre quant à elle une chute de signal atteignant 20 % pour 25 μM d'aptamère. Dans ce cas, il semble donc que la molécule soit reconnue, mais avec une affinité moins grande que pour la *L-Tym*. De ce fait, pour 25 μM d'aptamère, seule une faible proportion de cible a été complexée, si bien qu'il est difficile d'extraire une valeur de K_d sur la base de ces résultats expérimentaux.

L'aptamère anti *L-Tym* ayant été sélectionné à des fins thérapeutiques comme inhibiteur de topoisomérase, il était intéressant de tester le potentiel de reconnaissance de cet aptamère contre une *L-Tyr* contenue dans un peptide. En effet, la sélection de l'aptamère a été faite contre la *L-Tyrosinamide* et non la *L-Tyrosine* afin de mimer une liaison peptidique (R-CO-NH-R'). Un peptide de 7 acides aminés ($NH_2-Tyr-Ala-Gln-Pro-Gln-Pro-Phe-COOH$) avec une tyrosine *N*-terminale a donc été testé. Bien que ce peptide ait une masse molaire de 957 g.mol⁻¹, il reste de plus faible dimension devant l'aptamère (15262 g.mol⁻¹), si bien qu'il devrait rester possible de discriminer la forme libre du peptide de la forme complexée à l'aptamère.

Expérimentalement, ce peptide est très bien détecté en utilisant la catalyse du phénol de la *L-Tyr* (Fig.39). Néanmoins, l'addition d'aptamère ne provoque pas de variation très significative du courant de catalyse.

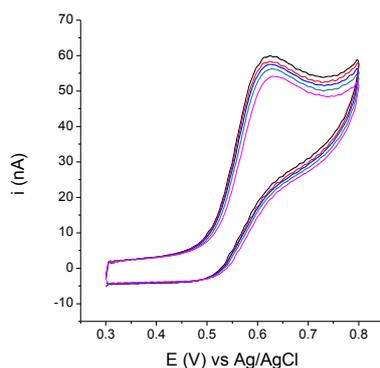


Fig 39 : Voltammogrammes d'une solution de peptide à 5 μM , $[\text{Os}^{\text{III/II}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ à 1 μM , $[\text{D-Apta}_{49}] = 0, 2, 5, 10, 20 \mu\text{M}$, $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, température ambiante.

Ces résultats montrent la grande spécificité de l'aptamère pour sa cible, et des sites d'interaction peuvent être proposés : l'absence de l'amine et de l'amide faisant perdre l'affinité, ces fonctions interagissent avec l'aptamère par liaisons hydrogène. La perte d'affinité par la substitution de l'amide par la chaîne peptidique pourrait être expliquée par un encombrement stérique empêchant la bonne conformation d'être adoptée.

g. Enantiosélectivité

Dans le but de tester l'énantiosélectivité du D-Apta_{49} , des expériences de reconnaissance avec la D-Tym ont été réalisées. Sur la Figure 40, l'ajout de D-apta_{49} en solution ne provoque pas de diminution très significative du courant d'oxydation de la D-Tym , indiquant que la réactivité croisée du D-apta_{49} vis-à-vis de la D-Tym est négligeable.

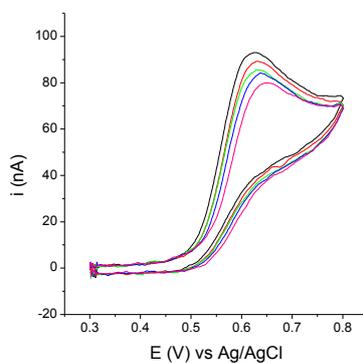


Fig 40 : voltammogrammes d'une solution de D-Tym à 5 μM , $[\text{Os}^{\text{III/II}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ à 1 μM , $[\text{D-Apta}_{49}] = 0, 2, 5, 10, 20 \mu\text{M}$, $\nu = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, température ambiante.

L'ADN étant également une molécule chirale via le ribose, l'énantiomère du D-Apta_{49} , le L-Apta_{49} , a été utilisé pour reconnaître la D-Tym . Comme indiqué sur la figure 41.a, lorsque la quantité de L-Apta_{49} croît en solution, l'intensité du courant diminue, conformément à la contribution croissante de la forme liée de la D-Tym dans la réaction électrocatalytique.

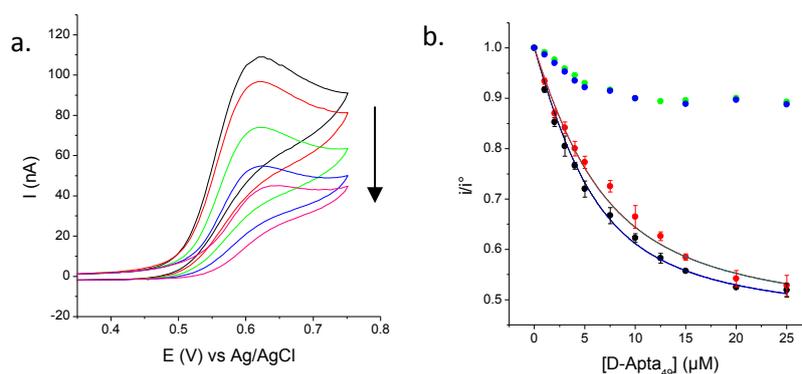


Fig 41 : a. Voltammogrammes d'une solution de *D*-Tym 5 μM, [Os^{III/II}(bpy)₃]^{3+/2+} à 1 μM, [L-Apta₄₉] = 0, 2, 5, 10, 20 μM, $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, température ambiante.

b. Représentation graphique $i/i^\circ=f([D\text{-apta}_{49}])$ pour le couple *L*-Tyrm/*D*-apta ($n=3$), *D*-Tyrm/*L*-Apta ($n=3$), *L*-Tyrm/*L*-Apta et *D*-Tyrm/*D*-Apta

L'ajustement de ces résultats expérimentaux (Fig 41.b) nous permet d'extraire une valeur de $K_d = 3,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ et une valeur de $i_p^\infty/i_p^0 = 0,44 \pm 0,01$. Ces valeurs sont très proches de celles déterminées pour le couple image dans un miroir c'est-à-dire la *L*-Tym vis-à-vis du *D*-Apta₄₉ ($K_d = 2,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$, $i_p^\infty/i_p^0 = 0,45 \pm 0,01$).

Compte tenu de la sensibilité de cette méthodologie électrochimique, de la spécificité et de l'énantiosélectivité de l'aptamère pour *L*-Tym, il est envisageable d'utiliser ce système modèle afin d'étendre cette méthodologie à des cibles non électroactives et, *in fine*, d'évaluer la performance de la technique pour la mesure *d.e.e*. Pour se faire, une méthode de détection électrochimique par compétition a été développée, nécessitant la synthèse d'analogues de la cible modifiée par une sonde électrochimique.

II-2- Compétition

Les stratégies de dosage reposant sur une réaction compétitive en présence d'une molécule marquée ont été largement utilisées en médecine pour le dosage de nombreuses molécules d'intérêt biologique. Ces techniques sont basées sur la détection d'une cible modifiée par un radioélément ou un fluorophore, mais peu d'études décrivent l'utilisation de marqueurs électrochimiques¹⁵⁹. Les techniques compétitives consistent à déplacer une cible marquée de son récepteur par ajout de cible non marquée en solution (Fig 42).

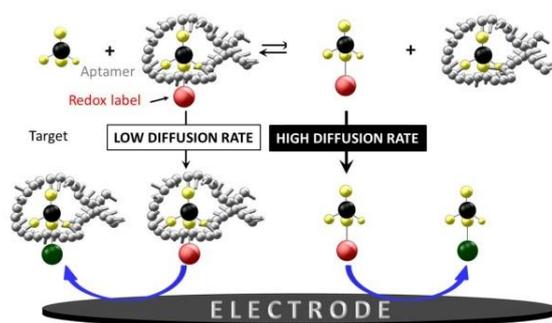


Fig 42 : Principe général d'un dosage compétitif par électrochimie¹⁵⁴.

Le dosage compétitif peut alors être décrit par les deux réactions de complexations bimoléculaires suivantes :



Avec $K_d = (C_T \cdot C_A)/C_{AT}$ (12a)

$K_d^* = (C_{T^*} \cdot C_A)/C_{AT^*}$ (12b)

Où K_d^* représente la constante de dissociation de la cible marquée, C_{T^*} la concentration en cible marquée et C_{AT^*} la concentration en complexe cible marquée/ $D\text{-Apta}_{49}$.

Sur la base de la loi d'action de masse, il est possible de trouver une solution analytique de C_{AT^*} (Annexe II p136), qui dépend des concentrations C_A , C_T et C_{T^*} ainsi que de K_d et K_d^* .

Le dosage compétitif envisagé ici restant basé sur une différence de coefficient de diffusion entre les cibles libres et complexées, il est alors possible d'exprimer le courant normalisé à partir de (7):

$$\frac{i_p}{i_p^0} = 1 - \frac{C_{AT^*}}{C_{T^*}^0} \cdot \left(1 - \frac{i_p^\infty}{i_p^0}\right) \quad (13)$$

L'équation (13) est générale pour la description d'un dosage compétitif électrochimique basé sur la différence de mobilité entre la sonde libre et complexée à l'aptamère.

a. Marquage de la $L\text{-Tym}$ par des marqueurs redox

Le *design* des cibles modifiées pour un bio-essai compétitif électrochimique a été guidé par des considérations propres à la méthodologie de transduction utilisée :

- 1- le choix de la sonde électrochimique ne doit pas modifier la solubilité de la sonde.
Deux sondes ont été étudiées: le méthylviologène dicationique réductible à potentiel cathodique et un ferrocène neutre, oxydable à des potentiels anodiques;
- 2- l'affinité de l'aptamère pour la cible d'intérêt et la sonde devant être comparable, une approche par screening basée sur une variation systématique de la fonction d'attache et de la longueur du lien entre la sonde rédox et la $L\text{-Tym}$ a été entreprise afin d'optimiser la reconnaissance de la sonde;

3- Le choix du site de fonctionnalisation de la *L*-Tym par le marqueur rédox : trois positions de marquage ont été identifiées (fig 43):



Fig 43 : Sites de marquage de la *L*-Tym par un marqueur rédox

Seules les positions (a) et (b) ont été étudiées, la position (c) étant la moins réactive. Le groupe amine est à priori le site de fonctionnalisation le plus prometteur, puisque le groupe de recherche ayant isolé l'aptamère a immobilisé la *L*-Tym par cette fonction sur une résine de sépharose⁷⁸ pour la procédure *SELEX* (Fig 44).

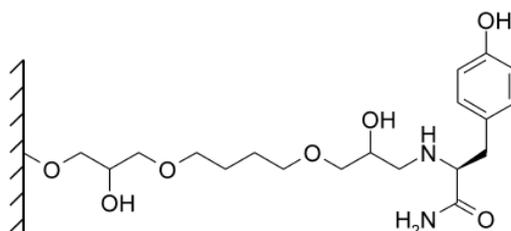


Fig 44 : *L*-Tym greffée sur sépharose⁷⁸

L'amine primaire a donc été transformée en amide via un couplage peptidique ou en amine secondaire via une addition nucléophile. La fonctionnalisation sur le site (a) via la fonction phénol en produisant un dérivé éther a également été étudiée.

L'ensemble des synthèses (annexe III p138) ayant été réalisées par Claire Fave, Bernd Schöllhorn, Julie Moreau et Noémie Laloui, elles ne seront pas détaillées ici¹⁶⁰.

i. Marquage sur l'amine

Deux dérivés ferrocényls de la *L*-Tym ont été synthétisés, l'un avec un lien amine entre l'amine de la *L*-Tym et le ferrocène, l'autre avec un lien amide (fig 45.a et b). Dans les deux cas, la distance séparant la *L*-Tym et la sonde rédox est du même ordre de grandeur, mais la nature du lien (amide vs amine) peut influencer la solubilité et/ou le potentiel standard du ferrocène.

Trois dérivés marqués sur la fonction amine par un méthylviologène dicationique avec des liens de différentes longueurs (1, 5 et 10 carbones) entre la fonction amine et la partie bipyridine ont été synthétisés (fig 45.c). La taille variable de ce lien a été choisie afin de nuancer la gêne stérique et l'influence des deux charges positives du viologène.

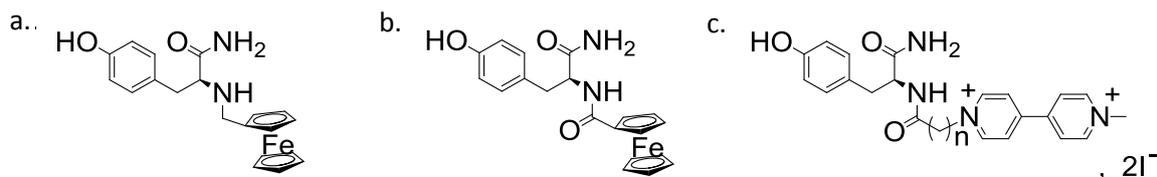


Fig 45 : a. *L*-Tym modifiée par un ferrocène via un lien amine : *L*-Fc-amine-Tym
 b. *L*-Tym modifiée par un ferrocène via un lien amide : *L*-Fc-amide-Tym
 c. *L*-Tym modifiée sur l'amine par le méthylviologène, $n = 1, 5, 10$: *L*-MV_{*n*}-Tym

Les *L*-Tym modifiées par un groupement ferrocenyl ont d'abord été caractérisées par voltammétrie cyclique (Fig 46.a) : ces deux molécules présentent des vagues monoélectroniques réversibles à 0,15 V vs Ag/AgCl pour le lien amine et 0,37 V vs Ag/AgCl pour le lien amide. Cette différence de potentiel standard apparent est due à l'effet inductif attracteur de l'oxygène de la fonction amide, qui rend l'oxydation plus difficile. Le courant d'oxydation mesuré au-delà de 0,45 V (vs Ag/AgCl) correspond à l'oxydation irréversible du phénol. Ces deux voltammogrammes illustrent le rôle crucial de la fonction d'accroche de la sonde sur son potentiel standard apparent.

Pour les molécules marquées par le méthylviologène, un voltammogramme typique des viologènes est observé, avec deux vagues réversibles (Fig 46.b), correspondant aux réductions successives du dication à $E_1^{0'} = -0,60$ V vs Ag/AgCl et du monocation à $E_2^{0'} = -1,00$ V vs Ag/AgCl. La longueur des chaînes entre le viologène et la *L*-Tym ne changent que faiblement ces valeurs de potentiel.

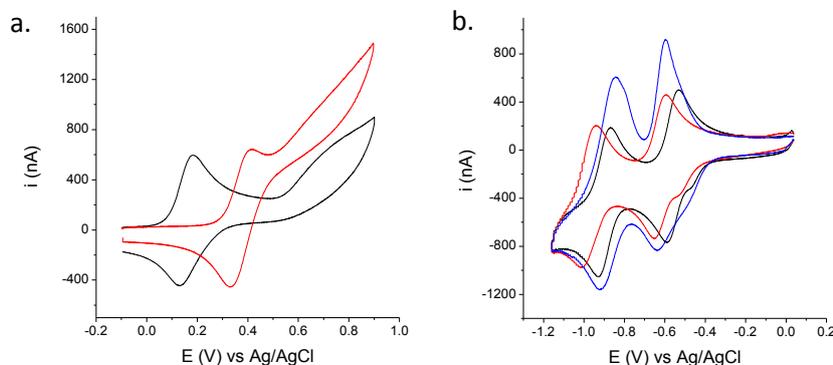


Fig 46 : a. Voltammogrammes de *L*-Fc-Amine-Tym et *L*-Fc-amide-Tym à 50 μ M
 b. Voltammogrammes de *L*-MV-C₁-Tym, *L*-MV-C₅-Tym et *L*-MV-C₁₀-Tym à 50 μ M
 $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, température ambiante.

Afin de mesurer l'affinité du *D*-Apta₄₉ vis-à-vis de ces molécules de synthèse, des tests de reconnaissance reprenant le protocole de détection directe de *L*-Tym ont été réalisés. Cependant, aucune extinction du signal n'a pu être mise en évidence en présence d'aptamère, indiquant une perte de reconnaissance. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats : soit les sondes redox gênent la reconnaissance par effet stérique, soit la conversion d'une amine primaire en amine secondaire ou en fonction amide affecte considérablement la reconnaissance.

La synthèse d'une *L*-Tym modifiée sur l'amine par une chaîne alkyle de quatre carbones a alors été réalisée (Fig 47.a). Cette expérience permet d'évaluer le rôle du bras qui sépare la *L*-Tym de la sonde

électrochimique dans la perte de reconnaissance des traceurs marqués via l'amine, en s'affranchissant de l'encombrement stérique des sondes redox.

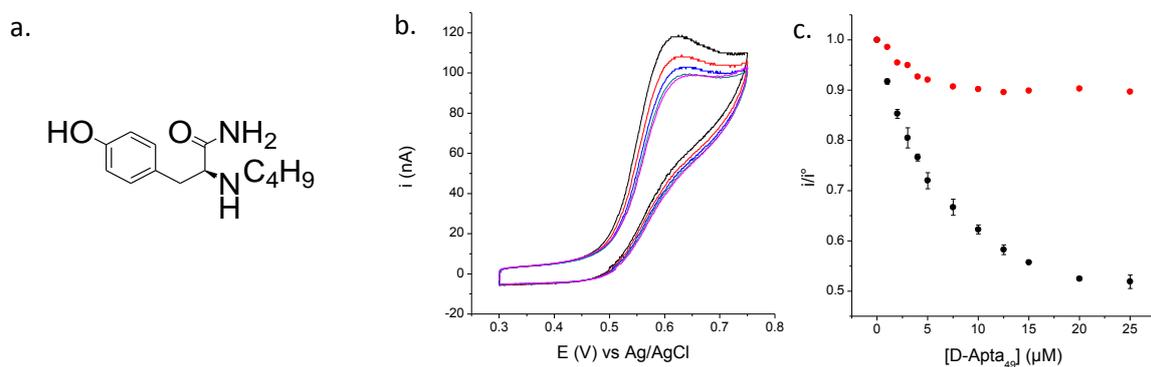


Fig 47 : a. *L*-C₄H₉-amine-Tym

b. Voltammogrammes d'une solution de *L*-C₄H₉-amine-Tym 5 μM, [Os^{III/II}(bpy)₃]^{3+/2+} à 1 μM, [D-Apta₄₉] = 0, 2, 5, 10, 20 μM, $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, température ambiante.

c. Représentation graphique $i/i^\circ = f([D\text{-apta}_{49}])$ pour le couple *L*-Tyrm/*D*-Apta₄₉ (*n* = 3), de *L*-C₄H₉-amine-Tym /*D*-Apta₄₉

Cette molécule n'ayant pas été modifiée sur le phénol, celui-ci reste oxydable par catalyse. Un test de reconnaissance a pu être réalisé dans les mêmes conditions expérimentales que pour la *L*-Tym (*i.e.* 5 μM de cible, [Os^{III/II}(bpy)₃]^{3+/2+} = 1 μM). Cependant, l'oxydation catalytique du phénol ne varie pas de façon significative avec la concentration en aptamère (Fig 47.b et c), signifiant que la stratégie de fonctionnalisation utilisée n'est pas adéquate pour la reconnaissance, suggérant que la fonction amine primaire de la *L*-Tym est indispensable à la reconnaissance par l'aptamère.

ii. Marquage sur le phénol

Les synthèses de *L*-Tym modifiées via la fonction phénol (site (a)) ont été réalisées (Fig 48). Pour cette catégorie de sonde, le pentaméthylferrocène a été envisagé en raison de son potentiel standard distinct ($E^{0'} = 0,15 \text{ V}$) de celui du ferrocène ($E^{0'} = 0,45 \text{ V}$). Cette différence pourrait être d'une grande importance pour des tests de détection multiplexés, où à des potentiels distincts pourraient être détectés des molécules différentes.

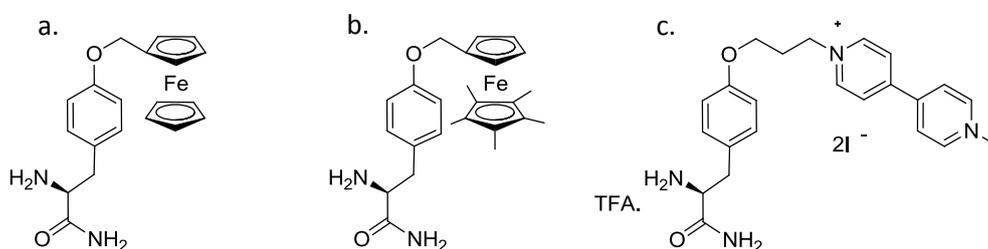


Fig 48 : a. *L*-Tym modifiée via le phénol par un ferrocène : *L*-Tym-Fc

b. *L*-Tym modifiée via le phénol par un pentaméthylferrocène : *L*-Tym-ptFc

c. *L*-Tym modifiée via le phénol par un viologène : *L*-Tym-MV

L'étude électrochimique en solution de ces molécules montre que les sondes redox greffées se comportent classiquement avec des vagues d'oxydation et de réduction bien définies (fig 49).

La molécule de *L*-Tym modifiée par le ferrocène présente un $E^{0'} = 0,18$ V tandis que la *L*-Tym-penta-Fc a un $E^{0'} = 0,05$ V. Ce décalage dans les potentiels standards s'explique par l'effet inductif donneur des groupes méthyls. La *L*-Tym modifiée par le methylviologène présente un $E_1^{0'} = -0,70$ V et $E_2^{0'} = -1,00$ V vs Ag/AgCl.

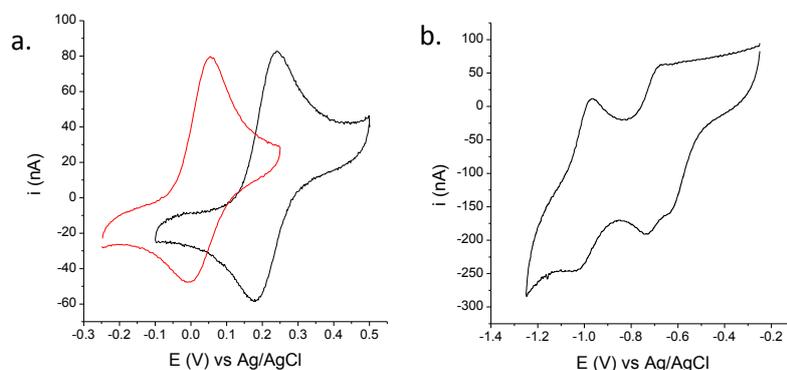


Fig 49 : a. Voltammogrammes de *L*-Fc-Tym, *L*-penta-Fc-Tym à 5 µM, $v = 50$ mV.s⁻¹, température ambiante.

b. Voltammogrammes de *L*-MV-Tym à 2 µM, $v = 100$ mV.s⁻¹, température ambiante.

Pour mesurer l'affinité de ces sondes vis-à-vis de l'aptamère, une solution de *L*-Tym marquée a été étudiée par voltammétrie cyclique en présence de concentrations croissantes en aptamère. Pour la sonde *L*-Tym marquée par le pentaméthylferrocène, aucune baisse d'intensité des pics d'oxydation et de réduction de la sonde redox n'a pu être observée. Cette molécule n'est donc pas reconnue par l'aptamère.

A l'opposé, lorsqu'une solution de 5 µM *L*-Tym marquée au ferrocène (*L*-Tym-Fc) est mise en présence de concentrations croissantes en aptamère, une diminution progressive des pics d'oxydation et de réduction du marqueur ferrocène est observée (Fig 50.a). Cette chute de signal est spécifique de la séquence d'aptamère, puisque pour la même expérience réalisée en présence d'une séquence aléatoire, aucune diminution significative du courant faradique n'est observée (Fig 50.b). Cette molécule est donc bien reconnue par l'aptamère.

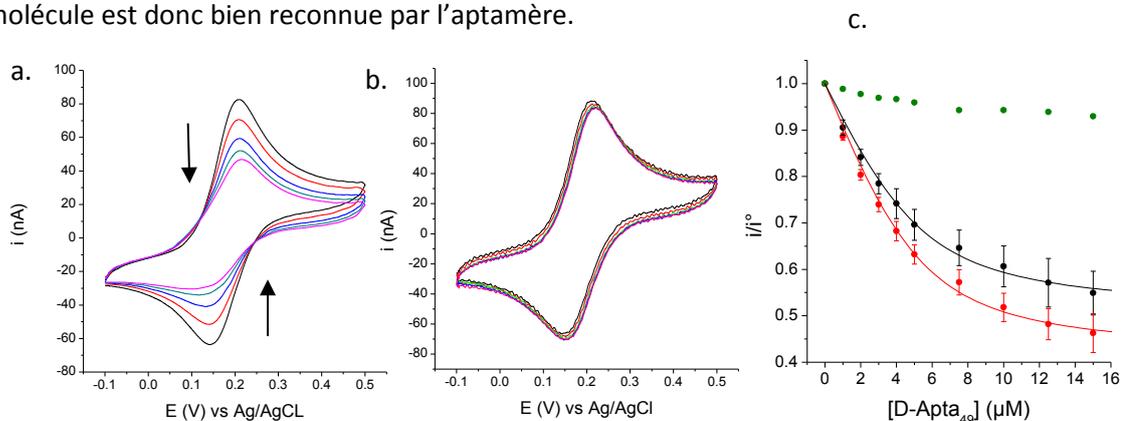


Fig 50 : a. Voltammogrammes d'une solution de *L*-Tym-Fc 5 µM, $[D\text{-Apta}_{49}] = 0, 2, 5, 10, 20$ µM, $v = 50$ mV.s⁻¹, température ambiante.

b. Voltammogrammes d'une solution de *L*-Tym-Fc 5 µM, $[L\text{-Aléa}_{49}] = 0, 2, 5, 10, 20$ µM, $v = 50$ mV.s⁻¹, température ambiante.

c. Représentation graphique $i/i^0 = f([D\text{-apta}_{49}])$ pour le pic d'oxydation ($n = 3$), de réduction ($n = 3$) et dans le cas du *D*-Aléa₄₉.

L'expression du courant de pic est différente de celle présentée dans le cas de l'oxydation catalytique de la fonction phénol, puisqu'il s'agit ici d'une réaction redox monoélectronique réversible (Annexe I p129). Le courant de pic anodique ou cathodique a alors l'expression suivante :

$$i_p = 0,446FSC_{T^*}^0\sqrt{D_{T^*}}\sqrt{\frac{Fv}{RT}} \quad (14)$$

Où $C_{T^*}^0$ et D_{T^*} sont respectivement la concentration et le coefficient de diffusion de la *L*-Tym marquée.

L'équation (7) peut être réétablie sur la base de l'équation (14) et utilisée pour ajuster les résultats expérimentaux (Fig 50.c). Ainsi, des valeurs de $K_d^{ox} = 1,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$ avec $(i_p^\infty/i_p^0)_{ox} = 0,50 \pm 0,02$ et $K_d^{red} = 1,1 \pm 0,3 \mu\text{M}$ avec $(i_p^\infty/i_p^0)_{red} = 0,41 \pm 0,02$ ont pu être déterminées en utilisant respectivement les pics d'oxydation et de réduction. Les valeurs i_p^∞/i_p^0 restent comprises entre 0,32 et 0,55. Ces résultats démontrent que la forme oxydée de la *L*-Tym-Fc est plus facilement détectable que la forme réduite, en raison de sa vitesse de diffusion plus grande.

Des expériences similaires ont été menées avec la *L*-Tym modifiée par le méthylviologène *via* le phénol (Fig 48.c). Sur la Fig 51.a, une diminution des pics de réduction et d'oxydation est bien observée lors de l'ajout de *D*-apta₄₉, comparée aux voltammogrammes obtenus avec le *D*-Aléa₄₉ (Fig 51.b). Cette molécule est reconnue par l'aptamère. Néanmoins, la ligne de base étant difficilement répétable d'une expérience à l'autre, le relevé des intensités de pic est délicat et peut conduire à des résultats difficilement quantitatifs.

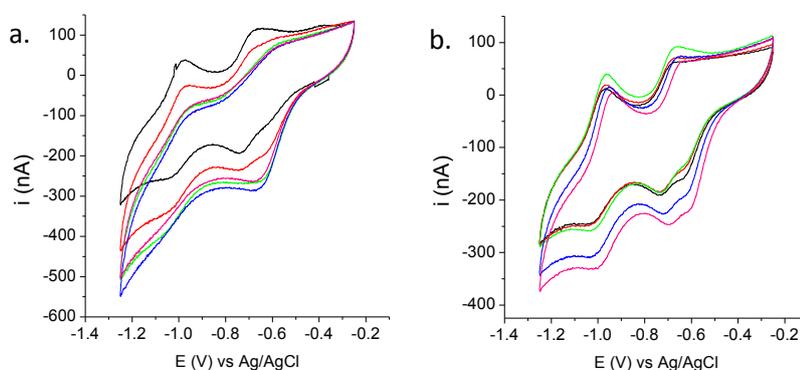


Fig 51 : a. Voltammogrammes d'une solution de *L*-Tym-MV 2 μM , [*D*-apta₄₉] = 0, 2, 5, 10, 20 μM , $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, température ambiante.
b. Voltammogrammes d'une solution de *L*-Tym-MV 2 μM , [*D*-Aléa₄₉] = 0, 2, 5, 10, 20 μM , $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, température ambiante.

C'est en utilisant la voltammétrie à vague carrée qu'il a été possible d'estimer une valeur de K_d (Fig 52). Dans cette méthode, la variation de potentiel en fonction du temps consiste en une progression par palier avec deux impulsions carrées de même amplitude, de même durée et de signes opposés. Le courant différentiel est calculé en retranchant les deux courants successifs mesurés à la fin de chaque impulsion. Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet de varier le potentiel à des vitesses beaucoup plus élevée qu'en voltammétrie cyclique, et d'améliorer la sensibilité par une augmentation du rapport courant faradique/courant capacitif.

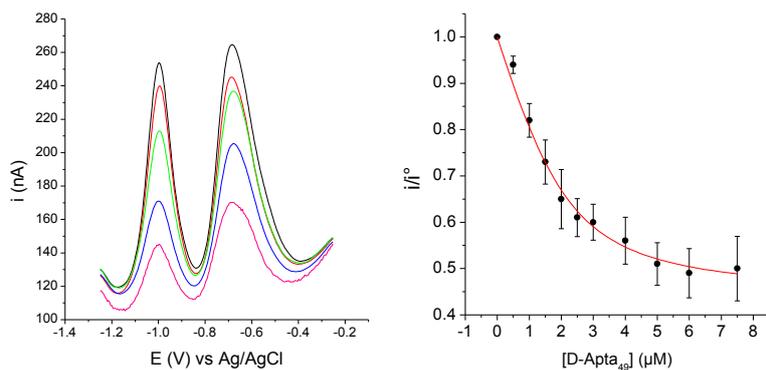


Fig 52 : a. Voltammétrie à vague carrée d'une solution de *L-Tym-MV* 2 μM , $[D\text{-Apta}_{49}] = 0, 1, 2, 4, 7,5 \mu\text{M}$, fréquence = 25 Hz, Amplitude = 20 mV, Marche = 5 mV, température ambiante.
b. Représentation graphique $i/i^\circ = f([D\text{-Apta}_{49}])$ pour le pic à $E = -1 \text{ V}$ ($n = 4$).

L'équation (7) peut être utilisée pour extraire par régressions non linéaires les valeurs de K_d et i_p^∞/i_p^0 . Le paramètre $i_p^\infty/i_p^0 = 0,43 \pm 0,03$ est proche de celui déterminé pour la *L-Tym* ($i_p^\infty/i_p^0 = 0,45 \pm 0,01$), ainsi que pour la *L-Tym-Fc* ($i_p^\infty/i_p^0 = 0,41 \pm 0,02$). Comme pour la sonde marquée par le ferrocène, le $K_d = 0,58 \pm 0,15 \mu\text{M}$ est inférieur à celui de la *L-Tym*.

c. Dosage compétitif en phase homogène

Le développement d'un dosage compétitif électrochimique a été mis au point et validé en utilisant la *L-Tym-Fc*. Pour cela, une solution de sonde à 5 μM est préparée et caractérisée par voltammétrie cyclique. Puis, une quantité connue d'aptamère est ajoutée de telle sorte que les pics d'oxydation et de réduction de la sonde diminuent significativement conformément à la figure 50.c. Des quantités croissantes de cible sont ensuite introduites en solution. L'équilibre thermodynamique *L-Tym-Fc/D-Apta₄₉* est alors déplacé par compétition avec la cible, ce qui donne lieu à une réaugmentation du signal réversible du ferrocène (Fig 53.a).

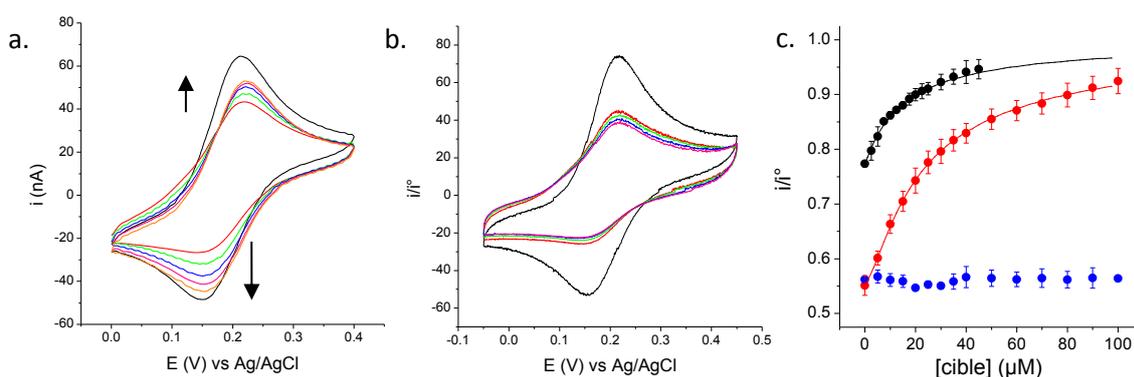


Fig 53 : a. Voltammétrie cyclique d'une solution de *L-Tym-Fc* 5 μM , *L-Tym-Fc* et *D-Apta₄₉*, puis en présence de 10, 25, 50 et 100 μM de *L-Tym*
b. Voltammétrie cyclique d'une solution de *L-Tym-Fc* 5 μM , *L-Tym-Fc* et *D-Apta₄₉*, puis en présence de 10, 50 et 100 μM de *D-Tym*
 $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, température ambiante.
c. Représentation graphique de la variation d'intensité du pic de réduction en fonction de la concentration en cible introduite, $i/i^\circ = f([cible])$, pour $[L\text{-Tym-Fc}] = 5 \mu\text{M}$ et $[D\text{-apta}_{49}] = 10 \mu\text{M}$ ($n=2$) ou 3 μM ($n = 2$). Témoin négatif réalisé pour $[D\text{-Tym}]$ ($n = 2$).

Une concentration en aptamère de 3 μM a d'abord été utilisée pour abaisser le signal de départ de 13 % (Fig 53.c, points noirs). L'expérience a ensuite été répétée avec une concentration plus forte en aptamère (10 μM) de manière à démarrer d'un signal encore plus faible (Fig 53.c, points rouges). Cette dernière expérience a également été réalisée en ajoutant de la *D*-Tym (Fig 53.b et c) en tant que témoin négatif.

A l'aide de l'équation (13), et sur la base du K_d et du paramètre i_p^∞/i_p^0 déterminés précédemment pour la *L*-Tym-Fc, il est possible de faire un ajustement non linéaire des résultats expérimentaux représentés figure 53.c et d'en extraire la constante de dissociation de l'aptamère pour sa cible originale (Annexe II p136). Pour les concentrations en aptamères de 3 et 10 μM , des $K_d = 2,8 \pm 0,4 \mu\text{M}$ et $K_d = 2,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ont été respectivement déterminés, en bon accord avec les résultats obtenus en détection directe de la *L*-Tym.

D'autres molécules analogues de la *L*-Tym ont également été testées : la *L*-Tym-MV (fig 48.c) et la *L*-Phénylalaninamide (Fig 55), non électroactive. Pour confirmer la spécificité de reconnaissance pour la molécule marquée par la sonde méthylviologène sur le phénol, un témoin a également été réalisé en utilisant la *L*-MVC₅-Tym (Fig 45.c).

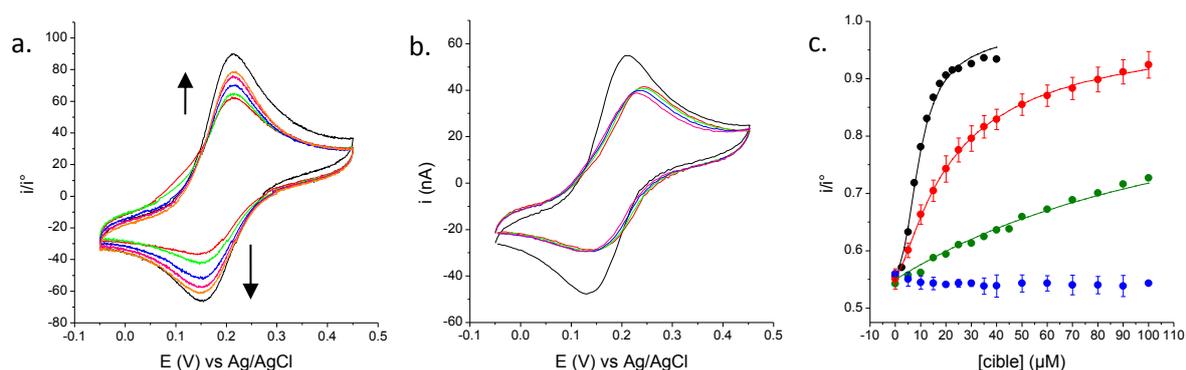


Fig 54 : a. Voltammogrammes d'une solution de *L*-Tym-Fc à 5 μM , *L*-Tym-Fc/*D*-Apta₄₉, puis en présence de 5, 10, 15 et 40 μM de *L*-Tym-MV
 b. Voltammogrammes d'une solution de *L*-Tym-Fc à 5 μM , *L*-Tym-Fc/*D*-Apta₄₉, puis en présence de 10, 25 et 50 μM de *L*-MVC₅-Tym
 $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, température ambiante.
 c. Représentation graphique $i/i^\circ = f([cible])$, pour [*L*-Tym-Fc] = 5 μM et [*D*-apta₄₉] = 10 μM en présence de *L*-Tym-MV, *L*-Tym (n=2), *L*-Phénylalaninamide et *D*-Tym (n = 2).

L'ajout de *L*-Tym-MV marquée sur le phénol déplace la *L*-Tym-Fc de l'aptamère comme en témoigne la remontée des pics d'oxydation et de réduction de la sonde Fig 54.a. La représentation graphique de cette évolution permet de déterminer un $K_d = 0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$, valeur proche du $K_d = 0,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ déterminé plus directement en voltammétrie à vague carrée. A l'opposé, aucune variation de signal n'est observée suite à l'ajout de *L*-MVC₅-Tym (Fig 54.b), confirmant l'absence de reconnaissance dans le cas d'un marquage via l'amine de la *L*-Tym. Enfin, le test réalisé avec la *L*-Phénylalaninamide permet d'extraire un $K_d = 22 \pm 2 \mu\text{M}$, proche du $K_d = 25 \pm 1 \mu\text{M}$ déterminé par ITC¹²⁰.

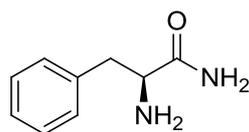


Fig 55 : L-Phénylalaninamide (L-Phen)

La différence d'affinité existante entre la *L*-Tym et la *L*-Phen ($K_d^{Phen} = 6,5. K_d^{Tym}$) souligne le rôle de l'atome d'oxygène dans l'interaction entre l'aptamère et la cible. De plus, puisqu'il n'y a pas de perte de reconnaissance lorsque l'hydrogène de la fonction hydroxyle est substitué, il semble que l'interaction n'engage pas le proton. Toutefois, il est également possible que l'interaction se produise seulement avec le cycle aromatique et que les différences d'affinité reflètent les variations de densité électronique sur le cycle aromatique. Ces hypothèses suggèrent, d'après le concept d'Ogston, que le troisième point de reconnaissance nécessaire à l'énantiosélectivité de l'aptamère pourrait ne pas être la fonction phénol, mais le cycle aromatique de la *L*-Tym par interactions de type π -stacking. Pour explorer cette hypothèse, l'énantiosélectivité vis-à-vis de la *D*-phénylalanine pourra être testée, ou la reconnaissance de la *L*-Alaninamide, qui ne présente pas de phényl, pourra être évaluée. Si cette dernière présente une affinité comparable à celle de la *L*-Phénylalaninamide, nous pourrions conclure que le cycle aromatique n'interagit pas avec l'aptamère.

La synthèse d'analogues électroactifs et les déterminations directes et indirectes de leur affinité pour l'aptamère auront permis de déterminer trois, voire quatre sites d'interactions entre le récepteur et la *L*-Tym : les fonctions amine et amide, l'oxygène du phénol et/ou le cycle aromatique (annexe III p138).

d. Utilisation en milieu biologique

La faisabilité de ces nouvelles méthodologies électrochimiques en milieu biologique a été testée en utilisant du Serum de Veau Fœtal (SVF). Ce milieu est constitué des éléments élémentaires retrouvés naturellement chez l'homme: protéines (créatinine, albumine), enzymes (transaminase, phosphatase alcaline, lactate deshydrogénase...), lipoprotéines, cholestérol, glucose, ions (Ca^{2+} , Cl^- , Na^+ ...), acide urique, bilirubine... C'est donc un modèle complexe de départ pertinent. Cependant, les protéines contenues dans ce sérum étant également constituées de tyrosine et le complexe d'osmium catalysant l'oxydation de leur fonction phénol, le signal catalytique n'est pas spécifique de l'oxydation de la *L*-Tym. La détection directe n'étant pas possible, la détection par échange compétitif a été utilisée.

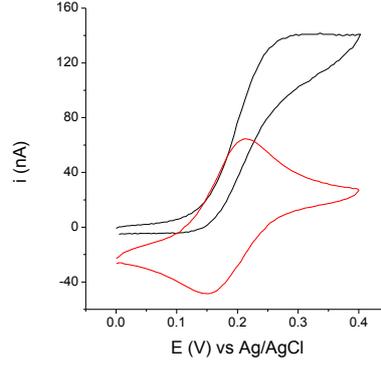


Fig 56 : Voltammogramme d'une solution de **L-Tym-Fc à 5 μ M** et **L-Tym-Fc à 5 μ M en SVF à 20%**.
 $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, température ambiante.

Dans les conditions expérimentales utilisées (i.e $[L\text{-Tym-Fc}] = 5 \mu\text{M}$ en SVF 20%), la réversibilité du marqueur ferrocène en voltamétrie cyclique disparaît au profit d'une vague irréversible augmentée, caractéristique de l'oxydation catalytique de molécules présentes dans le SVF par le ferricinium (Fig 56). Le ferrocène étant connu pour catalyser notamment l'oxydation de l'acide urique (AU) et de l'acide ascorbique (AA), constituants du SVF, ce résultat n'est finalement pas surprenant¹⁶¹. Ce régime catalytique stationnaire est exploitable en l'état, puisque le courant de plateau catalytique est directement proportionnel à la concentration en marqueurs redox à travers la relation suivante (Annexe I p129):

$$i_p = nFSC_{T^*} \sqrt{D_{T^*}} \sqrt{k_{T^*} C_{AU/AA}} \quad (15)$$

Où $C_{AU/AA}$ représente la concentration en molécules catalysées (supposées ici comme étant l'acide urique (AU) et l'acide ascorbique (AA)), D_{T^*} et k_{T^*} sont respectivement le coefficient de diffusion de la L-Tym-Fc et la constante cinétique d'oxydation catalytique.

Les mêmes hypothèses sur la conservation du régime de catalyse après ajout d'aptamère peuvent aussi être émises ici pour conduire aux expressions suivantes :

$$\frac{i_p}{i_p^0} = 1 - \frac{K_d + C_{T^*}^0 + C_A^0 - \sqrt{\Delta}}{2C_{T^*}^0} \left(1 - \frac{i_p^\infty}{i_p^0} \right)$$

$$\text{Avec } i_p^0 = nFSC_{T^*}^0 \sqrt{C_{AU/AA}} \sqrt{D_{T^*} k_{T^*}} \quad (16)$$

$$i_p^\infty = nFSC_{T^*}^0 \sqrt{C_{AU/AA}} \sqrt{D_{AT^*} k_{AT^*}} \quad (17)$$

Où D_{AT^*} et k_{AT^*} sont respectivement le coefficient de diffusion et la constante cinétique d'oxydation catalytique relative au complexe L-Tym-Fc/D-Apta₄₉.

L'affinité de la L-Tym-Fc pour l'aptamère a été déterminée en SVF 20 % (Fig 57). Sur la Fig 57.a, les courants stationnaires de catalyse diminuent bien avec la quantité croissante d'aptamères ajoutée en solution. Cette chute est bien spécifique de la séquence d'acide nucléique utilisée, par comparaison avec le brin non spécifique D-Aléa₄₉ (Fig 57.b).

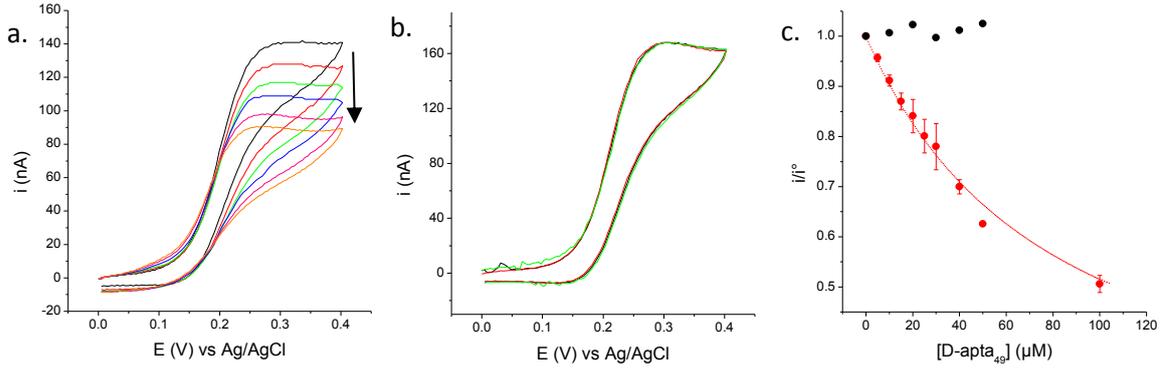


Fig 57 : a. Voltammétrie cyclique d'une solution de **L-Tym-Fc 5μM en SVF 20%**, $[D-Apta_{49}] = 10, 20, 30, 40, 50 \mu M$
 b. Voltammétrie cyclique d'une solution de **L-Tym-Fc 5μM en SVF 20%**, $[D-Aléa_{49}] = 20, 50 \mu M$
 $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, température ambiante.
 c. Représentation graphique de, $i/i^\circ = f([D-Apta_{49}])$, pour **L-Tym-Fc/D-Apta₄₉ (n=2)** et **L-Tym-Fc/D-Aléa₄₉**
 Résultats obtenus en milieu SVF 20%.

La représentation graphique $i/i^\circ = f([D-apt_{49}])$ sur la figure 57.c permet d'extraire un $K_d = 75 \pm 3 \mu M$, et une valeur du paramètre $i_p^\infty / i_p^0 = 0,13 \pm 0,02$. Cette valeur étant inférieure à $i_p^\infty / i_p^0 = 0,45$ déterminée sans SVF, il en est déduit une chute de réactivité catalytique de la fonction ferrocène lorsque la L-Tym-Fc est complexée à l'aptamère. En effet, pour un régime catalytique total stationnaire:

$$\frac{i_p^\infty}{i_p^0} = \frac{\sqrt{D_{AT^*} k_{AT^*}}}{\sqrt{D_{T^*} k_{T^*}}} = \sqrt{\frac{k_{AT^*}}{k_{T^*}}} \cdot \left(\frac{i_p^\infty}{i_p^0}\right)_{Diff} \quad (18)$$

Où $(i_p^\infty / i_p^0)_{Diff}$ représente le rapport des coefficients de diffusion lorsque la catalyse est limitée par la diffusion de la L-Tym sans SVF.

Des expériences de compétition ont ensuite été réalisées. Comme indiqué sur la Fig 58.a, après avoir fait chuter le signal de catalyse par introduction de l'aptamère, une augmentation de courant après l'ajout de L-Tym est observée (Fig 58.b).

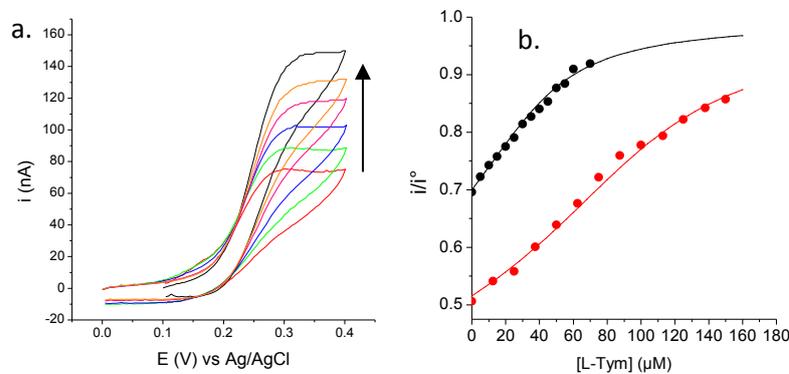


Fig 58 : a. Voltammétrie cyclique d'une solution de **L-Tym-Fc 5μM**, **L-Tym-Fc/D-Apta₄₉**, puis en présence de **25, 50, 100 et 125 μM** de L-Tym
 b. Représentation graphique $i/i^\circ = f([L-Tym])$ pour $[D-Apta_{49}] = 40 \mu M$ et **100 μM**
 Résultats obtenus en milieu SVF 20 %.

En utilisant l'équation (13), il est possible de faire un ajustement non linéaire des résultats expérimentaux représentés Fig 58.b.

Des $K_d = 9 \mu\text{M}$ et $K_d = 11 \mu\text{M}$ ont pu être déterminés pour des quantités respectives d'aptamère de 40 et 100 μM .

Compte tenu de la complexité du milieu utilisé dans ces expériences, il est très probable que l'aptamère, la sonde et la cible interagissent non spécifiquement avec les protéines, les lipides... contenus dans le SVF. Les pertes d'affinités mesurées dans ces conditions ne sont donc pas surprenantes.

e. Détermination d'excès énantiomérique

Pour évaluer la performance de détermination d'*e.e* du système, une expérience de détection de *L*-Tym en présence d'un excès de *D*-Tym a été réalisée en utilisant la Fig 53.c, servant de courbe standard de calibration. La *D*-Tym utilisée ayant été synthétisée au laboratoire, une solution concentrée à 5 mM final a d'abord été analysée seule.

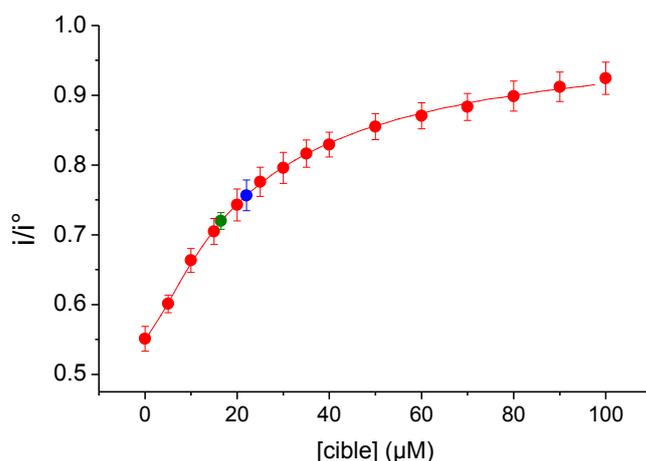


Fig 59 : Détermination de l'excès énantiomérique d'une solution de *D*-Tym à 5 mM et d'une solution de *D*-Tym à 5 mM/*L*-Tym à 5 μM

D'après la gamme étalon (Fig 59), une augmentation correspondant à $16,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ de *L*-Tym a été observée avec la solution de *D*-Tym. Deux interprétations sont possibles : soit la solution de *D*-Tym n'est pas énantiomériquement pure et un *e.e* peut être évalué à 0,33 %, soit il existe une reconnaissance *D*-Tym/*D*-Apta₄₉, exacerbée ici par la forte concentration de *D*-Tym utilisée, et un K_d peut être évaluée dans la gamme du mM. N'ayant pas de techniques séparatives à disposition, il n'a pas été possible d'estimer l'*e.e* de la *D*-Tym. Néanmoins, en ajoutant 5 μM de *L*-Tym à cette même solution de *D*-Tym, une augmentation de courant correspondant à $22 \pm 0,5 \mu\text{M}$ de *L*-Tym est obtenue. Ces résultats sont donc cohérents.

Ce résultat signifie qu'une impureté énantiomérique peut être détectée à 0,1 % dans un temps d'analyse très court (< 5 min). Ce résultat est très compétitif devant les performances atteintes en RMN notamment (*e.e* détectable à 1 %) ¹³⁴.

II-3- Conclusion

La combinaison de l'énantiosélectivité des aptamères et de l'électrochimie a permis de mettre au point une méthode de détection d'*e.e* très sensible, rapide et simple de mise en œuvre selon un principe d'échange compétitif. A terme, le développement de cibles en série (*L*) et (*D*) marquées par des groupes redox de E° différents permettra de réaliser la détection d'*e.e* au cours d'une seule mesure. De plus, les technologies actuelles de multiplexage permettent d'envisager le développement rapide de systèmes pour la détection d'*e.e* d'un grand nombre d'échantillons en parallèle.

Toutefois la sensibilité du système pourrait être améliorée. Deux axes peuvent être explorés : le premier concerne l'optimisation des processus de diffusion (en utilisant des réseaux de microélectrodes par exemple), le second concerne l'affinité de l'aptamère. Celle-ci peut en effet être optimisée, mais pour se faire, il est nécessaire d'acquérir des informations sur les relations entre séquence, structure et affinité de l'aptamère.

Dans cette perspective, les paramètres cinétiques du processus de reconnaissance biomoléculaire doivent être déterminés. C'est l'objet du chapitre suivant qui décrit la mise au point d'une méthodologie électrochimique dédiée à la détermination des constantes de vitesse d'association et de dissociation du complexe aptamère/cible¹⁶².