

SÉLECTION D'APTAMÈRES AVEC UN GRAND CHANGEMENT DE CONFORMATION

Par
Amal Lahmar

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.)
En sciences de Microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Charles Dozois
INRS-AFSB

Examineur externe

Philippe Dauphin Ducharme
Département de chimie
Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

Jonathan Perreault
INRS-AFSB

REMERCIEMENTS

C'est un agréable devoir de s'acquitter des dettes de reconnaissance cumulées tout au long de cette maîtrise.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma gratitude et mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui m'ont, de près ou de loin, permis, par leur collaboration, leur soutien et leur avis judicieux, de mener à bien ma maîtrise.

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à mon directeur de recherche, Pr. Jonathan Perreault, pour son encadrement et sa disponibilité tout au long de ma maîtrise, mais aussi pour ses qualités humaines et sa compréhension.

Je remercie aussi les professeurs Charles Dozois et Philippe Dauphin Ducharme d'avoir accepté de consacrer le temps pour examiner mon mémoire.

Mes énormes remerciements à mes collègues de laboratoire et du bureau sans exception.

Je dédie le fruit de ce travail à ma famille, sans laquelle je n'aurais pu achever ma maîtrise. À ma mère Kaouther, qui m'a comblé avec la tendresse et l'affection tout au long de mon parcours, sache que je n'ai rien de plus cher que toi, à mon père Riadh, qui m'a indiqué la bonne voie, en me rappelant que la volonté fait toujours les grands, sache que je serai toujours à tes côtés, à mon frère Wassim, qui m'a soutenu et a été mon ange gardien, sache que rien ni personne ne nous séparera, même pas ces 5502 km.

À ma deuxième famille, mes amis, avec qui j'ai pu partager ces années, car il n'y ait point de meilleur capital que celui de l'amitié durable et sincère, Azer et Rihab, qui ont été là pour mes moments les plus bas, merci pour votre présence irremplaçable.

RÉSUMÉ

Les aptamères sont des oligonucléotides d'ADN ou ARN sélectionnés *in vitro* pour reconnaître leur molécule cible avec une affinité et une spécificité élevée. Ces aptamères peuvent être subdivisés en deux classes, selon qu'ils changent ou non de conformation (c'est-à-dire qu'ils agissent comme « *switch* ») au contact du ligand. Les aptamères « *switch* » peuvent être mieux utilisés comme biocapteurs en utilisant le changement de conformation pour produire un signal. Pour sélectionner de tels aptamères, nous avons conçu une librairie comportant ≈ 3000 séquences à partir de la base de données *apta-index* qu'on a modifiées pour forcer un changement de conformation. L'approche SELEX (évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel) a été utilisée pour sélectionner les aptamères dont le contact des ligands produisait un changement de conformation, deux méthodologies ont été explorées. 1- La méthode de SELEX de capture qui est basée sur l'immobilisation de la librairie sur un support solide via un oligonucléotide de capture. 2- La méthode de SR-PAGE (Shifted Reverse-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) qui est basée le changement de migration dans un gel de polyacrylamide natif.

La librairie a été préparée et la fonctionnalisation des billes a été faite. La sélection par capture a ensuite été effectuée pour 11 ligands en parallèle pour quatre cycles de SELEX de capture en utilisant les billes magnétiques, et nous avons pu observer une évolution de l'enrichissement du SELEX et sélectionner une séquence potentielle suite au séquençage.

Mots-clés : Aptamère, SELEX de capture, *switch*, SR-PAGE, ligand

ABSTRACT

Aptamers are DNA or RNA oligonucleotides selected *in vitro* to recognize their target molecule with high affinity and specificity. These aptamers can be subdivided into two classes, depending on whether or not they change conformation (it means acting as a "switch") on contact with the ligand. Switching aptamers can be better used as biosensors by using the change in conformation to produce a signal. To select such aptamers, we designed a library of 3000 sequences from the apta-index database which we modified to force a "switch". The SELEX approach (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) was used to select aptamers whose contact with ligands produced a change in the conformation, two methodologies were explored. 1-The capture SELEX method which is based on the immobilization of the library on a solid support via a capture oligonucleotide. 2- The SR-PAGE (Shifted Reverse-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) method which is based on the migration change in a native polyacrylamide gel.

The library was prepared and the functionalization of the beads was done. Capture selection was then performed for 11 ligands in parallel for four rounds of capture SELEX using magnetic beads, and we were able to observe an evolution of SELEX enrichment and select a potential sequence following sequencing.

Keywords : Aptamer, capture SELEX, switch, SR-PAGE, ligand

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
1 INTRODUCTION	1
1.1 Les Biocapteurs	1
1.1.1 Généralité et historique	1
1.1.2 Définition et principe de fonctionnement.....	2
1.1.3 Classification des biocapteurs / Les différents types de biocapteurs d'affinité	3
1.2 Les Aptamères	7
1.2.1 Caractéristiques générales des aptamères	7
1.2.2 Structure.....	7
1.2.3 Leur importance et différence avec les anticorps	9
1.2.4 Les différents types d'aptamères	10
1.2.5 Les applications biotechnologiques des aptamères	14
1.3 Le SELEX.....	17
1.3.1 Historique du SELEX	17
1.3.2 Le principe du SELEX.....	17
1.3.3 Les différentes méthodes de SELEX.....	19
2 PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	25
3 MATÉRIEL ET MÉTHODES	27
3.1 Conception de la librairie et des amorces pour le SELEX	27
3.1.1 Conception des aptamères modifiés à partir de la base de données Apta-index	27
3.1.2 Amplification de la librairie	29
3.1.3 Amplification d'une librairie mutagène	29
3.2 Sélection des aptamères qui présentent un changement de conformation par la méthode Capture SELEX.....	30
3.2.1 Transcription chaude.....	30
3.2.2 Immobilisation de l'oligonucléotide de capture sur les billes magnétiques.....	32
3.2.3 Immobilisation de l'ARN sur l'oligonucléotide de capture	33
3.2.4 Processus de sélection in vitro	34
3.2.5 Réaction RT-PCR	36

3.2.6	<i>Test d'affinité des générations</i>	37
3.2.7	<i>Séquençage à haut débit</i>	38
3.2.8	<i>Séquençage Sanger</i>	38
3.2.9	<i>Test de spécificité avec des aptamères individuels</i>	39
3.2.10	<i>Le « in-line probing »</i>	42
3.3	Sélection des aptamères qui présentent un changement de conformation par la méthode SR-PAGE : une nouvelle méthode de sélection	51
3.3.1	<i>Principe et méthodologie</i>	51
3.3.2	<i>Optimisation de la méthode de SR-PAGE : température, temps de migration, voltage et taille du gel</i>	53
4	RÉSULTATS	55
4.1	Conception de la librairie et des amorces pour le SELEX	55
4.1.1	<i>Conception et visualisation des librairies d'ADN pour le SELEX</i>	55
4.2	Sélection des aptamères qui présentent un changement de conformation par la méthode Capture SELEX	57
4.2.1	<i>Immobilisation de l'oligonucléotide de capture sur les billes magnétiques</i>	57
4.2.2	<i>Immobilisation de l'ARN sur l'oligonucléotide de capture</i>	58
4.2.3	<i>Test d'affinité des générations</i>	60
4.2.4	<i>Séquençage Sanger</i>	62
4.2.5	<i>Analyse des résultats de séquençage à haut débit</i>	63
4.2.6	<i>Test de spécificité</i>	64
4.2.7	<i>Le « in-line probing » pour la détermination de la constante de dissociation K_d</i>	67
4.3	Sélection des aptamères qui présentent un changement de conformation par la méthode SR-PAGE : une nouvelle méthode de sélection	73
5	DISCUSSION	76
5.1	Sélection des aptamères qui présentent un changement de conformation par la méthode Capture SELEX	76
5.2	Sélection des aptamères qui présentent un changement de conformation par la méthode SR-PAGE : une nouvelle méthode de sélection	78
6	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	80
7	BIBLIOGRAPHIE	81
8	ANNEXES	102

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur. Adapté de (Soulignac, 2018)	2
Figure 2: Les différents types de biorécepteurs.....	3
Figure 3: Représentation schématique d'un anticorps. Adapté de (Maguis, 2008)	5
Figure 4: Représentation schématique d'un récepteur membranaire.....	5
Figure 5: Représentation d'une épingle à cheveux. Adapté de (Matharu et al., 2011)	7
Figure 6: Représentation d'un pseudo-nœud. Adapté de (Legendre, 2019).....	8
Figure 7: Représentation d'un G-Quadruplex. Adapté de (Sun et al., 2019).....	8
Figure 8 : Aptamère G-quadruplex (GO18-Td) interagissant avec son ligand la gonyautoxine des algues (M. Song et al., 2020).....	9
Figure 9: Détection de la présence de la cocaïne par un changement de la conformation de l'aptamère. Adapté de (Cekan et al., 2009)	11
Figure 10: Représentation des deux aptamères qui se lient à la thrombine. Adapté de (Deng et al., 2014)	12
Figure 11: Schéma du principe d'évolution systématique des ligands par procédé d'enrichissement exponentiel (SELEX).....	19
Figure 12: Représentation schématique du CE-SELEX. Adapté de (Mosing et al., 2005)	20
Figure 13: Représentation schématique du M-SELEX. Adapté de (Ahmad et al., 2011).....	21
Figure 14: Représentation schématique du Cell-SELEX. Adapté de (Fang & Tan, 2010)	22
Figure 15: Représentation schématique de la librairie utilisée en Capture-SELEX.	24
Figure 16: Conception de la librairie d'ADN pour le SELEX	28
Figure 17: Représentation schématique de la fixation de l'oligonucléotide de capture sur les billes magnétiques.....	33
Figure 18: Représentation schématique de la fixation de la librairie sur les billes via l'hybridation à l'oligonucléotide de capture.....	34
Figure 19: Représentation schématique du comportement de la librairie d'ARN au contact avec les ligands	35
Figure 20: Principe de la PCR d'assemblage	40

Figure 21 : Explication du mécanisme de la réaction « in-line ». Adapté de (Regulski & Breaker, 2008) .	47
Figure 22 : Schéma d'un gel de dégradation par in-line. Adapté de (Regulski & Breaker, 2008).	48
Figure 23: Représentation schématique de SR-PAGE (Shifted Reverse-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).	52
Figure 24: Représentation schématique du changement conformationnel attendu	56
Figure 25: Visualisation du produit de PCR de la librairie normale et mutagène	57
Figure 26: Résultats des images du microscope pour la vérification de l'étape d'immobilisation de l'oligonucléotide de capture sur les billes magnétiques	58
Figure 27: Test de radioactivité avec les différentes concentrations des billes et quantification de l'intensité de la radioactivité observée	59
Figure 28: Évolution de l'affinité des librairies.....	60
Figure 29: Quantification de l'intensité de la radioactivité observée dans les figures 31 et 32, pour les générations 1, 2, 3 et 4	61
Figure 30: Représentation du plasmide pGEM-T Easy avec SnapGene Viewer	62
Figure 31: Résultat de séquençage Sanger pour un clone de la génération 4	63
Figure 32: Distribution des tailles de lectures de séquences obtenues à la fin du SELEX.	64
Figure 33: Affinité des aptamères à leurs ligands.....	66
Figure 34: schéma représentant les séquences d'aptamères testés par in-line	67
Figure 35: Modulation de la structure de l'aptamère chloramphénicol induite par son ligand.....	68
Figure 36: Modulation de la structure de l'aptamère lysozyme induite par son ligand	69
Figure 37: Modulation de la structure de l'aptamère tétracycline induite par son ligand.....	70
Figure 38: Visualisation du profil de dégradation de chacun des aptamères lysozyme, chloramphénicol et tétracycline en présence des ligands non spécifiques.....	72
Figure 39: Scan des gels de SR-PAGE	74
Figure 40: Scan d'un gel de SR-PAGE non réussi	75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Comparaison entre l'aptamère et l'anticorps. Adapté de (Walter et al., 2012)	10
Tableau 2: Aptamères en essai clinique en Janvier 2021. Adapté de (Byun, 2021)	16
Tableau 3: Séquences utilisées pour la préparation de la librairie avec modifications	27
Tableau 4: Composition pour chaque tube et conditions de la PCR	29
Tableau 5: Composition pour chaque tube et conditions de la PCR	30
Tableau 6: La séquence de capture	32
Tableau 7: Les ligands utilisés pour les générations de SELEX	36
Tableau 8: Composition pour chaque tube et conditions de la PCR	37
Tableau 9: Séquences des amorces utilisées lors du séquençage Sanger	38
Tableau 10: Les différentes amorces utilisées pour l'assemblage PCR pour le test de spécificité.....	41
Tableau 11: Les différentes amorces utilisées pour la PCR d'assemblage	43
Tableau 12: Composition pour chaque tube et conditions de la PCR	44
Tableau 13: Les différentes séquences utilisées pour la Primer extension.....	44
Tableau 14: L'amorce utilisée pour l'extension d'amorces	45
Tableau 15: Composition pour chaque tube et conditions de la PCR	45
Tableau 16: Les ligands testés et leurs concentrations	50
Tableau 17: Les riboswitches utilisés pour optimiser la SR-PAGE	53
Tableau 18: Préparation des échantillons utilisés pour l'optimisation de la méthode SR-PAGE	54
Tableau 19: les résultats du Kd obtenu par in-line probing en comparaison avec les valeurs de la littérature	71
Tableau 20: liste des séquences de la librairie modifiée utilisée pour le SELEX	102

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C : Degré Celsius

µl : Microlitre

µM : Micromolaire

³²P : Radioisotope du phosphore

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFM : Microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscopy*)

APS : Persulfate d'ammonium (*Ammonium PerSulfate*)

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adénosine triphosphate

BBP : Bleu de bromophénol

CaCl₂ : Chlorure de calcium

c-di-GMP : Di-guanosine monophosphate cyclique

CE-SELEX : Électrophorèse capillaire-SELEX

cm : Centimètre

CMOS : Complementary metal oxide semi-conductor

Cy5 : Cyanine

DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge

Dnase : Désoxyribonucléase

dNTP : DésoxyriboNucléotides TriPhosphate

DTT : Dithiothréitol

E. coli : *Escherichia coli*

EDTA : Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique (Ethylenediaminetetraacetic acid)

EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor receptor)

EMSA : Test de déplacement de mobilité électrophorétique (electrophoretic mobility shift assay)

FDA : Food and Drug Administration

FMN : Flavine Mononucléotide

FW : Amorce sens

H : Heure

IgE : Immunoglobuline E

IgG : Immunoglobuline G

KCl : Chlorure de Potassium

Kd : Constante de Dissociation

LB : Lysogeny Broth

M : Molaire

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

Min : Minute

MIP : Molecular Imprint Polymers

mL : Millilitre

mM : Millimolaire

MnCl₂ : Chlorure de manganèse

M-SELEX : SELEX microfluidique

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

NaCl : Chlorure de Sodium

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

NaHCO₃ : Bicarbonate de soude

NEB : New England Biolabs

nM : Nanomolaire

PAGE : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

pb : Paire de bases

PCR : Réaction de Polymérase en Chaîne

pH : Potentiel hydrogène

pmol : Pico-moles

Qsp : Quantité suffisante pour

REV : Amorce antisens

rNTP : Ribonucléoside tri-phosphate

rpm : Rotations par minute

RT : Reverse transcriptase

rUTP : Uracile triphosphate

s : Seconde

SDS : Dodécylsulfate de Sodium

SELEX : Enrichissement Systématique de Ligands par Amplification Exponentielle

SOC : Super Optimal Broth

SPR : Résonance plasmonique de surface

SR-PAGE : Shifted-Reverse PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

TAE : Tris Acétate EDTA

TBE : Tris Borate EDTA

TBMg : Tris-Borate Magnésium

TEMED : Tetra Méthyl Ethylène Diamine

TPP : Thiamine Pyrophosphate

TRX : Tampon de transcription

U : Unité

UV : Ultra Violet

V : volt

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

XC : Bleu de xylène de cyanol

1 INTRODUCTION

1.1 Les Biocapteurs

1.1.1 Généralité et historique

La détection des molécules biologiques pour des fins de surveillance représente, de nos jours, un volet très important dans plusieurs domaines comme le domaine agroalimentaire (Alocilja & Radke, 2003), le domaine environnemental (Tovar-Sánchez et al., 2019) ou encore le domaine médical et pharmaceutique (Adrián et al., 2009; Yu et al., 2005). En revanche, les méthodes utilisées nécessitent des installations sophistiquées et des analyses qui requièrent des professionnels qualifiés, qui demandent un temps et un coût considérable et ceci peut être inadéquat dans plusieurs situations. C'est pourquoi, au cours des dernières décennies, le domaine des biocapteurs est devenu le sujet de recherche intense, puisque les biocapteurs représentent un grand potentiel de techniques plus simples avec leur caractéristique compacte et portative, plus rapide et moins couteuse tout en étant aussi spécifiques et sensibles, ce qui fait d'eux une meilleure alternative aux techniques traditionnelles existantes qui pourraient compléter ou remplacer les anciens appareillages (Bhalla et al., 2016; Ronkainen et al., 2010).

Plusieurs biocapteurs sont disponibles pour l'autodiagnostic sous forme de tests rapides: comme des tests de grossesse, de glycémie ou d'urine (Myszka et al., 1998; Scheller et al., 1996). Cependant, afin de répondre aux besoins des différents domaines il faudrait idéalement développer de nouveaux biocapteurs visant un grand éventail d'analytes (Y. Li et al., 2018; Webb et al., 2021; Wen et al., 2013).

C'est en 1956 que Leland Clark a développé le tout premier biocapteur qui quantifie l'oxygène dissous dans le sang, qu'on appelle « électrode à oxygène » (Clark, 1956) qui a été adaptée en 1962 pour quantifier le glucose dans le sang (Clark & Lyons, 1962). En 1967 Updike et Hicks se sont par la suite basés sur l'électrode de Clark pour développer une électrode enzymatique pour le glucose (Guilbault & Montalvo, 1969). C'est en 1969 que la première électrode potentiométrique a vu le jour grâce aux travaux de Guilbault et Montalvo, c'était une sonde qui permet la détection de l'urée basée sur l'enzyme uréase immobilisée (Guilbault & Montalvo, 1969, 1970) suivis du développement de l'immunocapteur par Suzuki et collaborateurs en 1975 afin de doser l'acide lactique et l'éthanol (Suzuki et al., 1975).

1.1.2 Définition et principe de fonctionnement

Un biocapteur est un dispositif d'analyse qui, en convertissant la réponse biologique en un signal mesurable ou détectable, permet de fournir des informations quantitatives ou qualitatives concernant l'analyte (Thévenot et al., 2001).

Trois composantes principales constituent le biocapteur :

- Le biorécepteur qui sert à reconnaître la cible à détecter et à l'identifier grâce à son site sélectif, qui peut être une enzyme, une cellule, un anticorps, etc. Dépendamment du type de biocapteur souhaité, le type de biorécepteur utilisé sera choisi, d'autres paramètres entrent aussi en jeu tel que sa spécificité, sa stabilité et sa durée de vie.
- Le transducteur (électrochimique, optique, acoustique) qui sert à transformer la réaction qui a eu lieu entre le biorécepteur et la cible en signaux mesurables (électrique, lumineux, fréquence) qui seront par la suite entreposés, amplifiés et traités. Le choix du transducteur se fait selon la nature du biorécepteur utilisé, sa réaction avec l'analyte et le type d'application visée. Le but est d'avoir un minimum de bruit de fond et un maximum de sensibilité.
- Les éléments électroniques qui seront responsables de l'annonce du résultat de façon simple, claire et facile à lire.

Idéalement, ces éléments seront intégrés dans un appareil portatif qui peut être facilement utilisé par des gens non spécialisés (Luzi et al., 2003; Vo-Dinh et al., 2001; Vo-Dinh & Cullum, 2000).

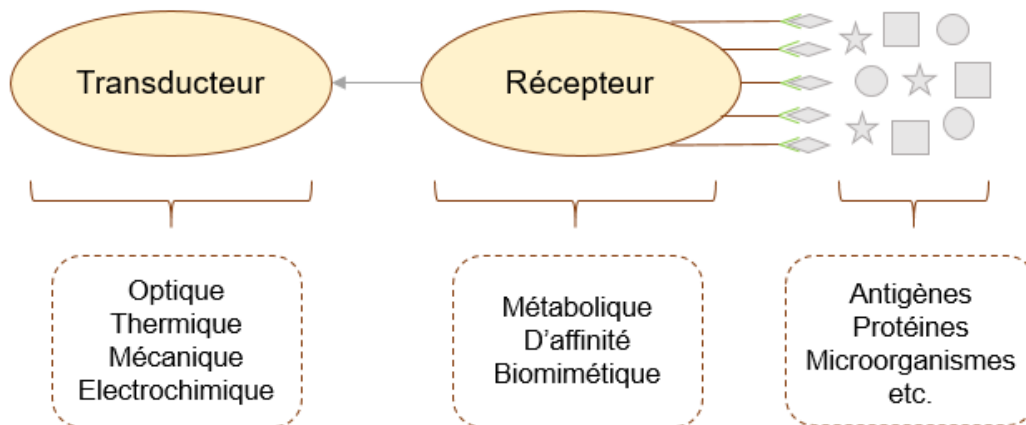


Figure 1: Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur. Adapté de (Soullignac, 2018)

1.1.3 Classification des biocapteurs / Les différents types de biocapteurs d'affinité

La classification des biocapteurs peut se baser sur le type de l'élément de reconnaissance utilisé qui est le biorécepteur. Les biorécepteurs sont à leur tour divisés en trois classes selon leur type d'activité :

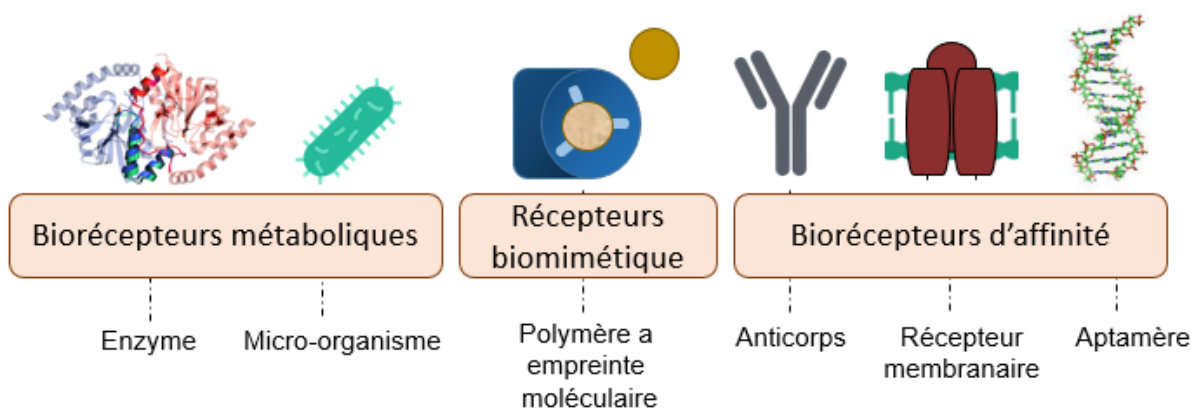


Figure 2: Les différents types de biorécepteurs

1.1.3.1 Les récepteurs métaboliques

Les biorécepteurs métaboliques sont définis par leur activité catalytique

- **Enzymes**

Depuis le commencement de la production des biocapteurs, les enzymes ont beaucoup été utilisés comme biorécepteur et le sont encore pour effectuer les analyses dans les différents domaines : biomédical (Rocchitta et al., 2016), environnemental (Amine et al., 2006) ou agroalimentaire (Monosik et al., 2012). Ceci revient aux caractéristiques catalytiques des enzymes qui leur donnent la propriété d'accélérer la vitesse d'une réaction et de rester intact en fin de cette dernière.

- **Microorganismes**

Dans ce genre de biocapteurs, les microorganismes les plus utilisés sont les bactéries, les champignons et les levures, qui contrairement aux enzymes, ne nécessitent pas des étapes de purification (Goers et al., 2017). Même avec les limites qu'ils présentent par rapport à la sensibilité

et la sélectivité, des biocapteurs microbiens ont été développés dans le domaine environnemental (Goers et al., 2017).

1.1.3.2 Les récepteurs biomimétiques

Imitant le fonctionnement des récepteurs naturels, ces Polymères à Empreintes Moléculaires (*Molecular Imprint Polymers*, MIPs) fonctionnent avec l'impression moléculaire. Les principaux avantages que présentent les MIPs sont la haute stabilité et le coût faible de la fabrication (Mehmet & Necip, 2017). Les sites de reconnaissance des MIPs réussissent à mimer les sites naturels grâce aux empreintes dont les formes (et charges) sont spécifiques à l'analyte choisi. En effet, au moment de l'exposition, les monomères fonctionnels se préconcentreront autour de la molécule cible pour qu'il y ait polymérisation, cette étape sera suivie par l'extraction de la molécule cible de la matrice du polymère ce qui causera la création de ces cavités spécifiques qui permettront au polymère de reconnaître l'analyte cible au moment de la mise en contact (Gui et al., 2018).

1.1.3.3 Les récepteurs d'affinité

Les biorécepteurs d'affinité sont définis par les différents types de liaisons (ioniques, hydrophobes, hydrogènes, Van der Waals) assurant l'interaction moléculaire (Perumal & Hashim, 2014).

- **Anticorps**

Un anticorps est une glycoprotéine qui a la capacité de reconnaître un antigène donné et de former un complexe anticorps-antigène par affinité. C'est la fraction se trouvant aux extrémités des chaînes lourdes et légères qui est responsable de la reconnaissance de l'antigène et qu'on appelle le paratope. La partie qui a la même fonction au niveau de l'antigène est appelée épitope.

On peut différencier deux types d'anticorps : les anticorps monoclonaux qui ne peuvent reconnaître qu'un seul type d'épitope et les anticorps polyclonaux qui sont un mélange de plusieurs anticorps et qui ont la capacité de reconnaître plusieurs épitopes sur un antigène donné.

La sensibilité et la rapidité de la détection des analytes par les anticorps a fait qu'ils sont très utilisés pour le développement des biocapteurs, même s'ils présentent quelques limites puisque l'affinité entre l'anticorps et l'antigène peut être affectée par les conditions du milieu comme la température ou le pH (Trilling et al., 2013).

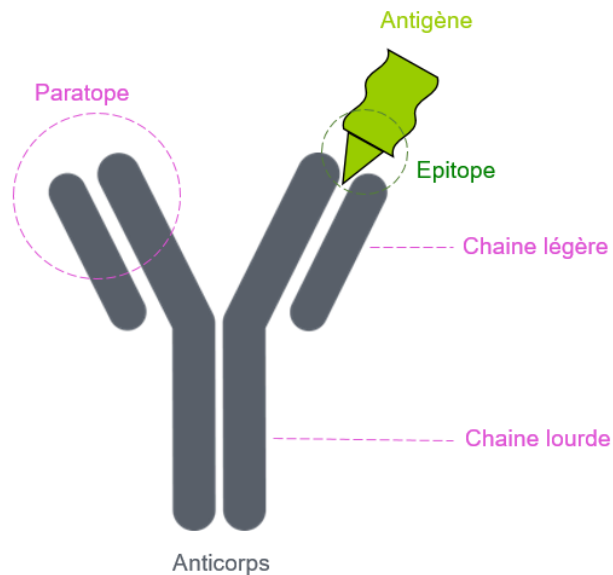


Figure 3: Représentation schématique d'un anticorps. Adapté de (Maguis, 2008)

- **Récepteurs membranaires**

L'utilisation de ces biorécepteurs dans la conception des biocapteurs est encore considérée comme un défi puisque l'étape de l'immobilisation de cette molécule sur la surface du transducteur est une étape cruciale (Reimhult & Kumar, 2008). Localisés au niveau de la membrane plasmique, les récepteurs membranaires sont des protéines qui sont capables de reconnaître et lier différents types de molécules du milieu extérieur (Galvez & Pin, 2003).

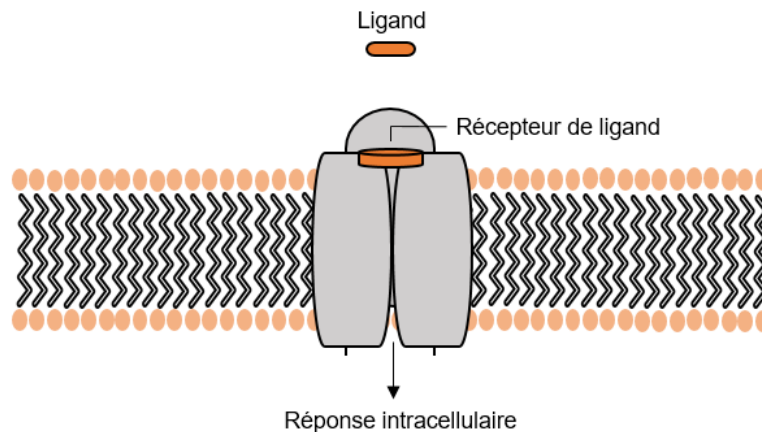


Figure 4: Représentation schématique d'un récepteur membranaire

- **Acides nucléiques**

Les « aptamères » qui sont des oligonucléotides simples brin ADN ou ARN, possèdent la capacité de former des pochettes de liaison dans leurs structures tridimensionnelles et de se lier à une cible d'intérêt. Dû à leur stabilité, leur spécificité et leur petite taille, les aptamères sont de plus en plus utilisés pour servir à la transduction d'un signal suite à la liaison à une molécule cible (Zhou et al., 2014). Également, les aptamères ont l'avantage d'être facilement modifiables, on peut donc effectuer des marquages sans nuire à leurs propriétés (Mairal et al., 2008). Ces avantages permettent une immobilisation efficace sur une surface, ce qui représente une étape très importante pour le développement d'un biocapteur.

L'utilisation des biocapteurs basés sur les aptamères a permis la détection de substances toxiques (Badie Bostan et al., 2017) et le repérage de pathogènes (Ranjbar et al., 2018; Y.-X. Wang et al., 2012), et ce, dans plusieurs domaines tels qu'en environnement et en agroalimentaire (Rapini & Marrazza, 2017).

Plusieurs éléments peuvent être pris en compte afin de classer les aptasenseurs, la manière la plus connue c'est selon le comportement de l'aptamère lors de l'interaction avec la molécule cible :

- Au moment de l'interaction avec la cible, la détection peut avoir lieu par interaction directe suite à l'augmentation de la masse qui est mesurable par transduction (Savran et al., 2004) comme l'exemple de la résonance plasmonique de surface (SPR) qui sert à mesurer la liaison du ligand sur son récepteur en raison d'un changement d'indice de réfraction d'un faisceau incident grâce au phénomène physique d'interaction matière-lumière (Homola et al., 1999). La deuxième classe, c'est quand la détection a lieu suite au repliement de l'aptamère, et c'est donc ce changement de conformation causé par la liaison à la cible qui engendrera le changement de position d'un marqueur fluorophore, par exemple initialement flanqué par l'extrémité de l'aptamère ayant un désactivateur (*quencher*), pour l'espacer du désactivateur en question et donc émettre ou non une fluorescence. Il faut noter que la classification des biocapteurs peut se baser sur le type de transduction utilisée qui peut être optique, thermique, mécanique ou électrochimique. Le choix du transducteur est aussi un paramètre important dû à son rôle qui consiste à émettre un signal détectable et facile à exploiter (Tran Minh, 1991).

1.2 Les Aptamères

1.2.1 Caractéristiques générales des aptamères

Dérivant du terme latin « aptus » qui veut dire « apte » ou « approprié à », les aptamères représentent un nouveau champ pour la recherche, puisque les aptamères sont de courtes séquences de nucléotides ADN ou ARN, simple brin, ayant des propriétés de liaison semblable à celles des anticorps et une capacité à se lier à un grand nombre de cibles (Silverman, 2009). La plus grande caractéristique des aptamères c'est leur spécificité et leur haute affinité aux ligands qu'ils lient. C'est grâce à un processus nommé Évolution Systématique de Ligands par Enrichissement EXponentiel (SELEX) qu'on parvient à isoler ces aptamères de taille qui varie entre 6 et 40 kDa, à partir d'une banque d'oligonucléotides synthétiques (Ellington & Szostak, 1990; Irvine et al., 1991), le SELEX sera décrit avec plus de détails dans la section 1.3.

Pour connaître le degré d'affinité d'un aptamère à une molécule donnée, c'est la constante de dissociation (Kd) qui est déterminée, plus cet indice est faible, plus l'aptamère a une haute affinité. Les aptamères présentent typiquement des constantes de dissociation (Kd) de l'ordre du micromolaire, parfois jusqu'au nanomolaire, picomolaire ou même femtomolaire (Kaushik & Dixit, 2016), qui reflètent leur affinité vis-à-vis la cible.

1.2.2 Structure

Les aptamères possèdent la capacité de se lier à différents types de molécules cibles grâce à leurs caractéristiques structurales particulières (Hermann & Patel, 2000; Patel et al., 1997), qui se classent en trois motifs structuraux courants :

- La structure épingle à cheveux

Dans un même brin, deux parties complémentaires s'apparient et laissent place à une boucle formée avec les nucléotides se trouvant au milieu (Goux et al., 2015).

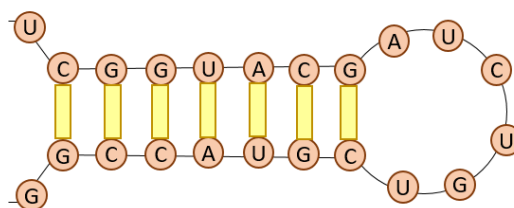


Figure 5: Représentation d'une épingle à cheveux. Adapté de (Matharu et al., 2011)

- La structure Pseudo-nœud

C'est quand certains nucléotides qui ne font pas partie de la tige, s'apparient à une partie de la boucle (Chaloin et al., 2002, p. 1; Jiang et al., 2015).

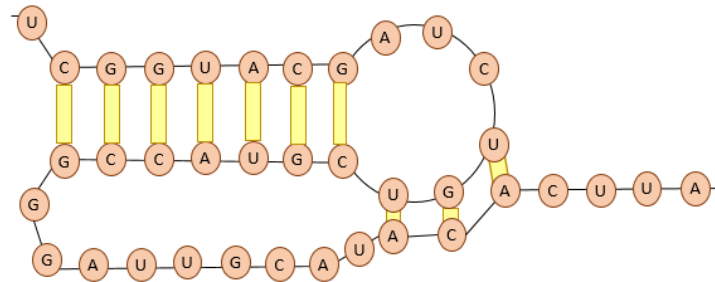


Figure 6: Représentation d'un pseudo-nœud. Adapté de (Legendre, 2019)

- La structure G-Quadruplex

C'est quand quatre guanines forment une structure en plateau en se rapprochant sur un plan cyclique. L'empilement de diverses structures planes forme les G-Quadruplex et la structure de ce dernier peut être stabilisée par un cation monovalent au centre, en particulier K^+ (T. Li et al., 2009).

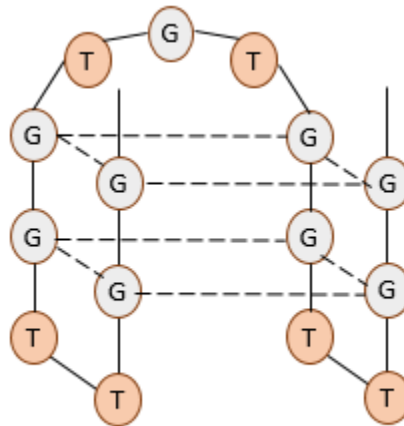


Figure 7: Représentation d'un G-Quadruplex. Adapté de (Sun et al., 2019)

C'est par de multiples types de liaisons, tels que les liaisons hydrogène, les interactions électrostatiques, les interactions de Van der Waals, les empilements de cycles aromatiques ou plusieurs interactions en même temps, que les aptamères se lient à leurs cibles qui peuvent être pratiquement tous types de molécules : des acides aminés, des oligosaccharides, des ions, des antibiotiques, des peptides ou des protéines (Hermann & Patel, 2000; Patel et al., 1997).

Les trois différents motifs structuraux décrits plus haut, peuvent d'une part être combinés de multiples façons avec des jonctions flexibles favorisant une structure tridimensionnelle qui

favorise un positionnement précis des groupements chimiques impliqués dans les interactions entre l'aptamère et la cible, et d'autre part suite à la combinaison à leurs cibles, ils peuvent impliquer un réarrangement de la structure tridimensionnelle ou même l'adoption d'une nouvelle structure qui intégrera la molécule cible dans l'architecture oligonucléotidique (Eaton et al., 1995; Patel et al., 1997). L'exemple de l'aptamère G-quadruplex (GO18-Td) illustre comment la structure tridimensionnelle d'un oligonucléotide aptamérique peut former une pochette de liaison pour interagir avec son ligand, la gonyautoxine des algues.

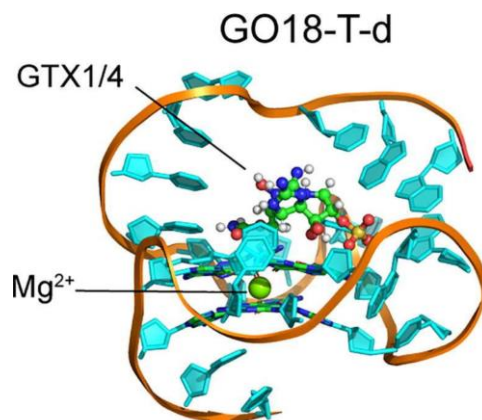


Figure 8 : Aptamère G-quadruplex (GO18-Td) interagissant avec son ligand la gonyautoxine des algues (M. Song et al., 2020)

1.2.3 Leur importance et différence avec les anticorps

Les aptamères sont, de nos jours, pris pour une alternative attrayante aux anticorps, grâce aux différents avantages qu'ils présentent (Jayasena, 1999). Avec les aptamères, on peut obtenir des affinités avec un Kd de l'ordre du pico-molaire et nano-molaire, ce qui est similaire aux Kd obtenus avec les anticorps pour leurs antigènes (Meure et al., 2008). Ceci est possible grâce à la haute spécificité des aptamères et à leur potentiel à différencier entre la cible et ses dérivés. On cite l'exemple de l'aptamère anti-théophylline avec la caféine, la différence entre la théophylline et la caféine consiste en un seul groupement méthyle, pourtant l'aptamère anti-théophylline possède une affinité dix mille fois moindre pour la caféine (Jenison et al., 1994).

Dans un contexte d'utilisation thérapeutique, comme pour le pegaptanib (Nimjee et al., 2017), l'utilisation des aptamères diminue de manière importante le risque de réactions immunitaires (Meure et al., 2008). Pour le système immunitaire humain, les aptamères ne sont pas des molécules immunogènes (Ireson & Kelland, 2006).

La possibilité d'optimiser les séquences d'aptamères présente aussi un énorme avantage puisqu'avec une simple soustraction, addition ou changement d'un nucléotide on peut augmenter

l'affinité de celle-ci (Wochner et al., 2008). Une fois la séquence optimisée, sa production est rapide et moins coûteuse, car, contrairement aux anticorps, elle ne nécessite pas la présence d'une cellule ou d'un animal pour la production, une simple synthèse chimique nous permet de produire l'ADN qui correspond à la séquence, à grande échelle si nécessaire (Simon et al., 2014).

Le **tableau 1** présente une comparaison entre les aptamères et les anticorps.

Tableau 1: Comparaison entre l'aptamère et l'anticorps. Adapté de (Walter et al., 2012)

Les aptamères	Les anticorps
Présentent une certaine stabilité à la température	Très sensibles à la température
La possibilité de diriger les modifications vers des sites bien précis	Les modifications chimiques ont lieu de manière aléatoire
Leur dénaturation est réversible et la régénération peut avoir lieu sans affecter l'activité	Leur dénaturation est irréversible et la régénération peut causer une inhibition de l'activité
Leur synthèse est chimique avec une reproductibilité possible et leur identification à lieu grâce à une sélection <i>in vitro</i>	Leur synthèse a lieu <i>in vivo</i> avec beaucoup de variations et leur production se fait via les animaux

1.2.4 Les différents types d'aptamères

- **Les aptamères qui changent de conformation :**

Le concept de « commutation de structure » ou de « commutateurs biomoléculaires » existe déjà dans la nature (Gerstein & Krebs, 1998). Le meilleur exemple à citer c'est les *riboswitches*, qui représentent un commutateur biomoléculaire à base d'acides nucléiques régulant l'expression génétique en interagissant avec de petites molécules. Ces derniers se composent d'un domaine aptamère qui est l'élément de reconnaissance et qui, en liant la cible, entrainera un changement de structure qui causera un changement de l'expression du gène, que ce soit en l'inhibant ou en l'activant (Nahvi et al., 2002). De ce fait, un grand intérêt se porte à la commutation de structure dans le but de développer des biocapteurs à base d'aptamères qui changent de structure suite à

la liaison avec la cible et ceci se base sur deux avantages essentiels. En premier lieu, les interactions cible-aptamère qui induisent une commutation de structure sont considérées comme des interactions très spécifiques et difficiles à simuler par des cibles non spécifiques (Wilson et al., 2019) . En deuxième lieu, la commutation de structure confère à l'aptamère un changement physique accentué qui facilite et simplifie le couplage aux mécanismes de transduction de signaux. Ainsi de nombreux aptamères à commutation de structure ont pu être couplés à un système qui relaye un signal pour détecter différentes cibles, tels que le mercure (Z. Wang et al., 2008), la quinine (Taylor et al., 2009), les IgE (Feng et al., 2011), l'adénosine (J. Liu & Lu, 2006) et bien d'autres.

Cette approche est souvent utilisée avec des méthodes de détection via la fluorescence, elle se base sur la capacité de l'aptamère à former un duplex ADN-ADN avec une séquence marquée par un fluorophore et une séquence complémentaire marquée par un désactivateur (*quencher*). Due à la proximité existante entre les deux fragments, le signal fluorescent est très faible, voire inexistant (mode : « off »), mais la formation du complexe aptamère-cible jouera son rôle en induisant le changement structural et en éloignant le désactivateur du fluorophore, induisant un signal fluorescent détectable (mode : « on »). Cette approche a permis de détecter l'ATP et la thrombine en produisant des signaux avec les aptamères anti-ATP et anti-thrombine (W. Liu et al., 2021; Yin et al., 2015).

L'aptamère de la cocaïne est un autre bon exemple utilisé avec un système de fluorophore combiné à un agent d'atténuation (*quencher*). Suite au changement structural, les deux groupements se trouvant aux extrémités se rapprocheront et il y aura donc perte du signal fluorescent qui était présent quand les deux extrémités étaient éloignées (Cekan et al., 2009; Stojanovic et al., 2001).

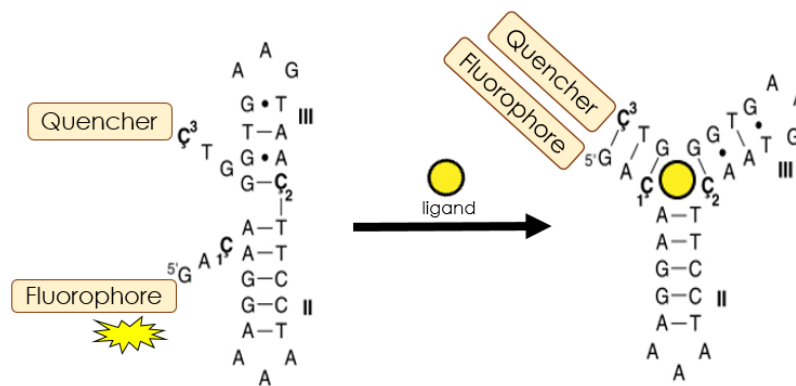


Figure 9: Détection de la présence de la cocaïne par un changement de la conformation de l'aptamère. Adapté de (Cekan et al., 2009)

Une adaptation du concept de commutation de structure a aussi été réalisée avec d'autres méthodes de détection comme les méthodes colorimétriques et électrochimiques (Giannetti & Tombelli, 2021)

- **Les aptamères qui ne changent pas de conformation :**

L'exemple le plus connu est l'aptamère de la thrombine, une sérine protéase jouant un rôle très important dans la cascade de coagulation (Davie & Kulman, 2006; Huntington, 2005) et participant dans certains cancers et la maladie d'Alzheimer (Franchini & Mannucci, 2012; Sokolova & Reiser, 2008). Deux aptamères pour la thrombine existent, possédant tous les deux une conformation formant un G-quadruplex stable (Macaya et al., 1993). Les deux aptamères sont constitués de 15 et 19 nucléotides, le premier interagit avec le site de reconnaissance du fibrinogène de la thrombine (Bock et al., 1992) et le second se lie au site de liaison à l'héparine de la thrombine (Tasset et al., 1997).

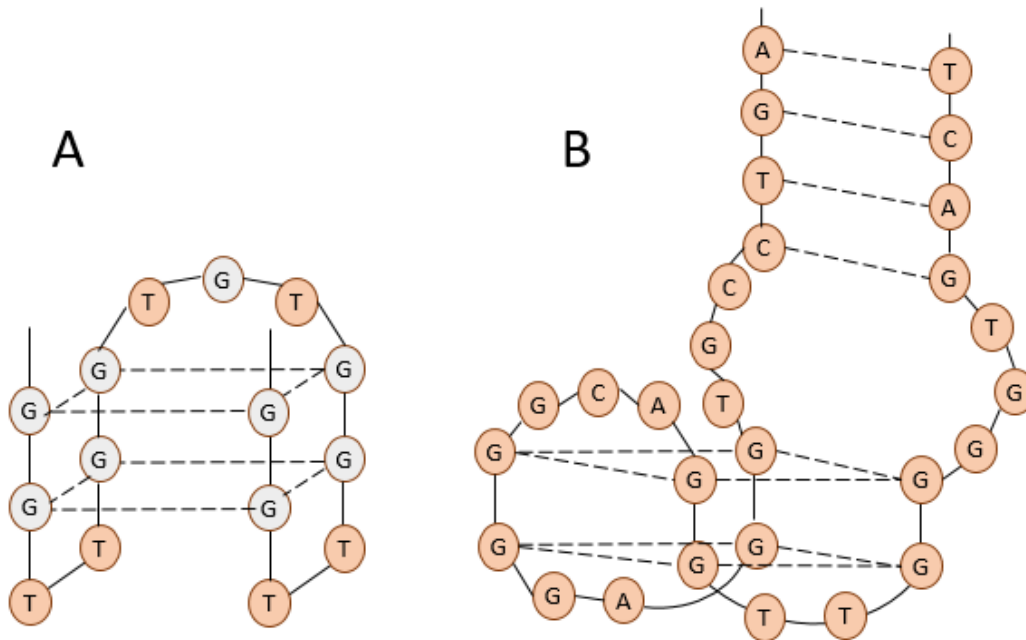


Figure 10: Représentation des deux aptamères qui se lient à la thrombine. Adapté de (Deng et al., 2014)

(A) Représentation de l'aptamère d'ADN de la taille 15pb et (B) Représentation de l'aptamère d'ADN de la taille 29pb. Les structures G-quadruplexes sont montrées dans la conformation de ces aptamères

- **Comparaison entre les aptamères ADN et les aptamères ARN :**

Un autre moyen de classer les aptamères, c'est selon qu'ils soient des aptamères d'ADN ou d'ARN. Au début des recherches concernant les aptamères, l'intérêt se portait principalement sur l'ARN, puisqu'ils étaient déjà connus pour leur capacité à former des structures tridimensionnelles complexes et diversifiées (Orava et al., 2010; Zhu et al., 2015). Outre que la spécificité parfois remarquable de leur liaison, certains aptamères d'ARN ont la capacité de discerner certains états redox de la même cible, comme l'aptamère du Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) qui démontre une préférence à lier sa cible quand elle est sous son état oxydé (NAD⁺) plutôt qu'à son état réduit (NADH) (Lauhon & Szostak, 1995). Malgré leurs avantages importants, les défis que présente l'utilisation des séquences d'ARN pour le développement d'aptamères sont notables. L'existence du groupe 2'-OH fait en sorte que les liaisons phosphodiester des molécules d'ARN sont plus sensibles à une dégradation chimique et ont une forte sensibilité aux ribonucléases qui, se retrouvant dans les environnements biologiques, peut causer la dégradation de l'ARN (Soutschek et al., 2004). De ce fait, plusieurs modifications peuvent être effectuées afin d'augmenter la résistance à la nucléase des aptamères d'ARN comme la modification du squelette phosphodiester, ou le remplacement de la fonction 2'-OH par des motifs 2'-O-méthoxy, 2'-amino ou 2'-fluoro (Keefe & Clod, 2008).

D'autres parts, le coût de la synthèse d'ARN est beaucoup plus élevé que pour l'ADN. De plus, lors du SELEX (pour sélectionner les aptamères), l'ajout d'une étape de transcription *in vitro* est nécessaire pour obtenir notre bibliothèque d'ARN à partir d'échantillons regroupés d'ADN, tout en travaillant dans des conditions sans ARNase.

Qu'ils soient à base d'ADN ou d'ARN, les aptamères, en tant que « qu'anticorps » chimique, représentent un outil très intéressant dans la recherche biologique ce qui explique qu'il existe plus que 16725 articles incluant le terme « aptamère » dans la base de données PubMed. Ceci explique le développement de plusieurs aptamères d'ADN comme l'aptamère Sgc-8 qui reconnaît la protéine tyrosine kinase et qui a aidé à l'identification d'un biomarqueur de cellules de leucémie lymphoblastique aiguë (Chang et al., 2013), l'aptamère TDO5 qui détecte les récepteurs IgG et qui peut être utilisé dans l'administration thérapeutique ciblée (Ray & White, 2010) et l'aptamère AS1411 que des recherches scientifiques ont prouvé sa capacité à reconnaître la nucléoline et qui peut être utilisé dans l'imagerie des cellules cancéreuses (Aravind et al., 2012), mais aussi plusieurs aptamères d'ARN comme l'aptamère anti CD4 utilisé dans le tri cellulaire (Zhang et al., 2010) ou encore l'aptamère EGFR qui reconnaît le récepteur du facteur de croissance épidermique utilisé dans l'isolement de cellules cancéreuses (Wan et al., 2010).

1.2.5 Les applications biotechnologiques des aptamères

Grâce à leurs propriétés récemment découvertes et à leur potentiel qui rivalise avec celui des anticorps, les aptamères représentent un nouvel outil pour le diagnostic, de même que les applications analytiques et thérapeutiques (Jayasena, 1999; Mairal et al., 2008; Tombelli et al., 2007). Ayant la capacité de reconnaître un grand nombre de cibles, les aptamères peuvent être utilisés dans différents domaines d'application (Iliuk et al., 2011) :

Le domaine de la sécurité alimentaire là où des aptamères ont été sélectionnés pour détecter de petites cibles moléculaires telles que les antibiotiques : la tétracycline (Niazi et al., 2008), l'oxytétracycline (Kim et al., 2009) et le chloramphénicol (Burke et al., 1997), mais aussi les pesticides (Stead et al., 2010), les herbicides (L. Fan et al., 2013) et les toxines comme l'ochratoxine A (Kuang et al., 2010).

Dans le domaine environnemental, des capteurs électrochimiques à base d'aptamères sont développés pour la détection de polluants environnementaux (Hayat & Marty, 2014), comme les métaux lourds dans l'eau tels que le mercure (Zeng et al., 2017), mais aussi des aptamères contre des cibles bactériennes telles que *Salmonella typhimurium* (Joshi et al., 2009).

Dans le domaine du diagnostic médical, les aptamères montrent leur efficacité, en termes de sensibilité, rapidité et coût, dans la détection des types cellulaires pathologiques comme les cellules cancéreuses. En effet, plusieurs aptamères ont été développés pour la détection de différents types de cancers comme : la reconnaissance des cellules cancéreuses du sein MCF-7 grâce à la sonde à base d'aptamère via la détection visuelle basée sur la couleur des cellules cancéreuses (Borghei et al., 2016), la détection des cellules cancéreuses de la prostate grâce à l'aptamère D3-21 par SELEX in vivo (Civit et al., 2019), la détection des cellules leucémiques grâce à l'aptamère Sgc8 via la fluorescence (Khoshfetrat & Mehrgardi, 2017).

Parmi les méthodes utilisées on retrouve celles qui sont basées sur des techniques de surface et qui nécessitent donc une immobilisation de la cible ou de l'aptamère sur une phase solide, ce sont des biocapteurs qui utilisent par exemple des techniques électrochimiques (Farjami et al., 2013) des techniques de résonance plasmonique (SPR) (Durand et al., 2014) ou l'utilisation de microbalances à quartz (Yao et al., 2009) ou de fibres optiques (Celebanska et al., 2019) et c'est ce qu'on appelle des méthodes de type « label-free » qui n'ont pas besoin d'un marquage particulier, mais c'est l'étape d'immobilisation qui constitue la partie délicate du processus. De ce fait, ce sont les biocapteurs de type optique qui ont une plus grande popularité du fait de leur facilité de mise en œuvre, ils ont généralement besoin d'un marquage indirect par l'enzyme via

la biotine (Lu et al., 2015), d'un marquage direct par une enzyme (Gao et al., 2017), mais le plus courant c'est le marquage par un fluorophore (Goux et al., 2015) où c'est le changement de signal fluorescent, résultant de la liaison à la cible, qui nous permet la détection.

Les aptamères étant similaires aux anticorps du point de vue de la capacité de liaison, ils ont été utilisés comme agent de ciblage dans la formulation de vecteurs, notamment afin d'administrer des médicaments chimiothérapeutiques de façon ciblée grâce à la greffe d'aptamère à la surface de liposomes (X. Li et al., 2013), on peut citer l'exemple de l'aptamère sgc8c qui, afin de diriger un médicament actif vers une cellule spécifique, va à la fois se lier aux cellules CEM (lymphoblastes humains) tout en conjuguant la doxorubicine qui est le médicament anticancéreux (Ray et al., 2013). Les aptamères ont été démontrés pour avoir le potentiel de libérer des médicaments protéiques hors d'hydrogels fonctionnalisés (Battig et al., 2012).

Avec une valeur estimée à 1.8 milliard de dollars en 2014, l'utilisation des aptamères en tant qu'agent thérapeutique connaît une croissance rapide (*Nucleic Acid Aptamers for Diagnostics and Therapeutics: Global Markets: BIO071C | BCC Research, s. d.*). Le meilleur exemple est le Pegaptanib (Macugen), qui est le premier médicament à base d'aptamère que la Food and Drug Administration (FDA) approuve en 2004, cet aptamère ayant la spécificité d'inhiber le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) afin de traiter la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (Banerjee & Nilsen-Hamilton, 2013; Shukla et al., 2007). Le **tableau 2** résume quelques aptamères qui sont en essai clinique afin d'être utilisés dans la thérapeutique.

Tableau 2: Aptamères en essai clinique en Janvier 2021. Adapté de (Byun, 2021)

Aptamère	Type	Cible	Indications	Statut
Macugen	ARN	VEGF (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)	-Dégénérescence maculaire liée à l'âge -Rétinopathie diabétique proliférante -œdème maculaire diabétique	Approuvé Phase 1 Phase 2
EYE001	ARN	VEGF (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)	-Dégénérescence maculaire -Néovascularisation choroïdienne -Maladie de von Hippel-Lindau	Phase 2 Phase 3 Phase 1
Fovista	ADN	PDGF (Facteur de croissance dérivé des plaquettes)	Dégénérescence maculaire liée à l'âge	Phase 2
AS1411	ADN	Nucléoline (protéine de liaison aux ARNr)	Leucémie myéloïde aiguë	Phase 2
ARC1779	ADN	vWF (Facteur de von Willebrand)	maladie de von Willebrand	Phase 2
ARC19499	ARN	TFPI (Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire)	Hémophilie	Phase 1
REG1	ARN	Factor IX (protéine sanguine impliquée dans la coagulation)	Maladie de l'artère coronaire	Phase 3
Nox-H94	ARN	Hepcidine (hormone peptidique qui régule le métabolisme du fer)	-Anémie -Phase terminale de la maladie rénale	Phase 1 Phase 2
68Ga-Sgc8	ADN	PTK7 (CCK4) (tyrosine kinase réceptrice)	Cancer colorectal	Phase 1
NU172	ADN	Thrombine (protéine de la coagulation sanguine)	Cardiopathie	Phase 2

1.3 Le SELEX

1.3.1 Historique du SELEX

La sélection *in vitro* par évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (SELEX) est une technique combinatoire utilisée pour découvrir de nouvelles biomolécules avec des fonctionnalités spécifiques (Prudent et al., 1994). La méthode de SELEX a été décrite indépendamment par Tuerk et Gold (Tuerk & Gold, 1990) et Ellington et Szostak (Ellington & Szostak, 1990) comme une technique pour développer des ligands pour des cibles protéiques ou des molécules organiques. D'autres pionniers de la sélection *in vitro* étaient Robertson et Joyce (Robertson & Joyce, 1990). Les trois groupes ont exploré des bibliothèques complexes de séquences d'oligonucléotides randomisées pour le criblage de molécules d'ARN de haute affinité liant des ligands contre diverses cibles (Geiger et al., 1996; Prudent et al., 1994; Robertson & Joyce, 1990).

1.3.2 Le principe du SELEX

La méthode expérimentale standard de SELEX consiste, à partir d'une bibliothèque d'oligonucléotides, en des séries itératives de sélection de séquences d'acides nucléiques qui se lient à une molécule cible, suivi d'une amplification, résultant en un enrichissement progressif de la bibliothèque avec des séquences présentant une affinité accrue pour la molécule cible (Irvine et al., 1991; Prudent et al., 1994; Sakamoto et al., 2005).

Pour cette approche combinatoire, la première étape consiste à synthétiser la banque d'oligonucléotides contenant des régions fixes sur les extrémités 5' et 3' où les amorces complémentaires peuvent se fixer pour l'étape d'amplification. Entre ces séquences fixes se trouvent des séquences aléatoires qui contiennent la diversité permettant l'affinité et la spécificité recherchées (Strehlitz & Stoltenburg, 2009).

Cette population d'oligonucléotides sera par la suite soumise à une étape de criblage via une sélection basée sur l'affinité pour une cible spécifique. La séparation peut être effectuée grâce à diverses manières telles que la chromatographie d'affinité (Vianini et al., 2001) ou des billes magnétiques (Cox & Ellington, 2001) qui toutes deux nécessitent l'immobilisation de la cible d'intérêt sur un support solide (Strehlitz & Stoltenburg, 2009).

Suite à la séparation, les séquences sélectionnées seront donc amplifiées par PCR (Polymerase chain reaction) grâce aux amorces qui s'hybrideront aux régions fixes, ce qui nous ramène à la fin du cycle de sélection. Cela crée le nouveau groupe de séquences enrichies qui sera utilisé

pour le cycle suivant de SELEX, et ainsi de suite pour chaque cycle (Strehlitz & Stoltenburg, 2009). Le changement des paramètres des lavages, du temps d'incubation et de la concentration permet d'augmenter la stringence au cours de ce processus, ce qui entraîne l'évolution de la population et un enrichissement du groupe se traduisant par une augmentation de son affinité de liaison à sa cible (Sakamoto et al., 2005; Strehlitz & Stoltenburg, 2009).

Les produits amplifiés sont utilisés pour le clonage, séquençage, analyse d'alignement et analyse de structure secondaire (Strehlitz & Stoltenburg, 2009).

Pour ce qui concerne la sélection des aptamères ARN, le protocole implique l'ajout de deux autres étapes qui consistent: en premier lieu à la transcription de la librairie d'oligonucléotide ADN afin d'avoir une librairie d'oligonucléotide ARN, cette étape est effectuée avant le début du cycle de sélection, en second lieu la transcription inverse des oligonucléotides ARN, cette étape est effectuée à la fin du cycle de sélection avant l'amplification par PCR (Stoltenburg et al., 2007).

De ce fait, on considère que la méthode de SELEX est une méthode combinatoire qui fait appel à trois étapes maitresses : la synthèse de la banque d'oligonucléotides, la sélection des aptamères potentiels et enfin l'identification des séquences maintenues (Mosing & Bowser, 2009).

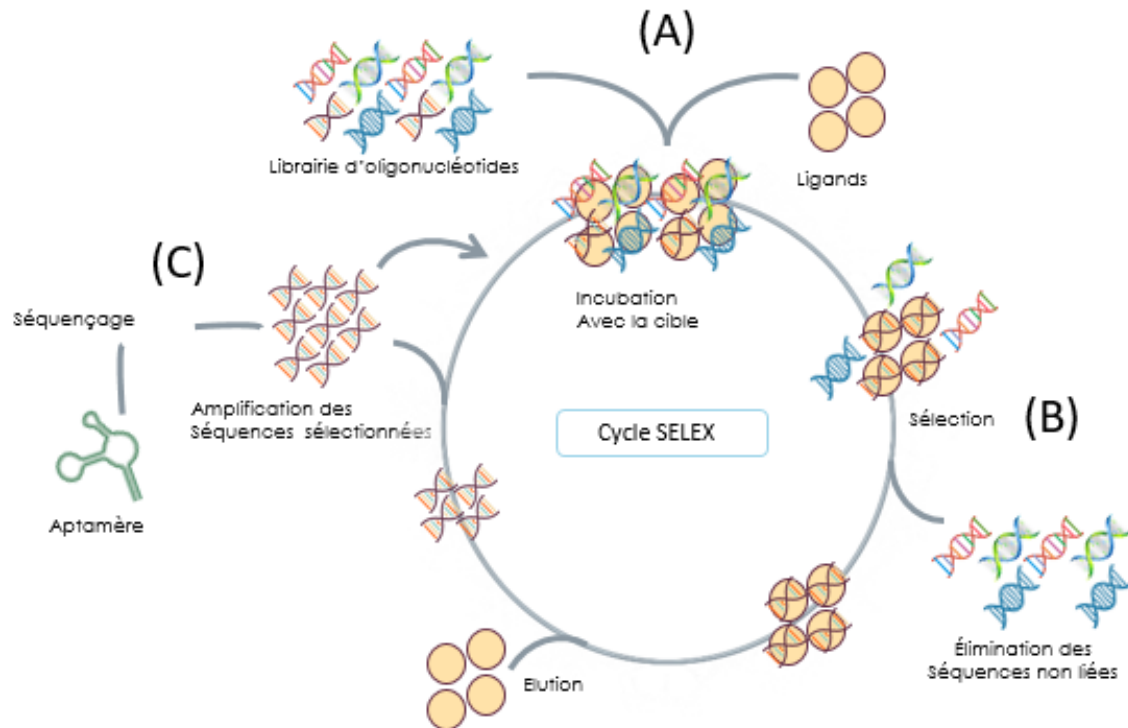


Figure 11: Schéma du principe d'évolution systématique des ligands par procédé d'enrichissement exponentiel (SELEX).

(A) Incubation de la librairie d'oligonucléotide avec les ligands cibles (B) La sélection consiste en la sélection des séquences interagissant avec les cibles et l'élimination des séquences non liées (C) Amplification et séquençage des séquences sélectionnées

1.3.3 Les différentes méthodes de SELEX

Plusieurs stratégies de SELEX ont été citées dans la littérature, la différence se situe généralement au niveau de la méthode de sélection

- **Électrophorèse capillaire-SELEX (CE-SELEX)**

Le CE-SELEX est une méthode qui fusionne les deux technologies : l'électrophorèse capillaire qui est une technique de séparation analytique des ions basée sur leur mobilité électrophorétique et leur charge (Mosing & Bowser, 2009), et le SELEX dans le but de faire un dépistage d'aptamères efficacement. Afin de différencier efficacement entre les complexes cible-aptamère

et les oligonucléotides non liés dans le champ électrique, le CE-SELEX utilise un mécanisme basé sur les différents rapports charge/masse des matériaux séparés dans le capillaire qui se traduisent par différentes migrations apparentes sous haute tension (Mendonça & Bowser, 2004). Comme le montre la **figure 12**, dans un processus CE-SELEX typique, les acides nucléiques randomisés de la bibliothèque est d'abord incubée avec la cible dans la solution libre; puis le mélange d'incubation est injecté dans les capillaires CE et séparé sous haute tension. Les acides nucléiques qui se lient à la cible montrent une mobilité apparente différente par rapport aux séquences non liées, et peuvent être collectés sous forme de fractions différentes (Mosing et al., 2005). Cependant, cette méthode est assez coûteuse, ne peut malheureusement pas être utilisée pour des cibles à petites molécules et limite aussi la taille de la librairie de départ (Nur et al., 2021).

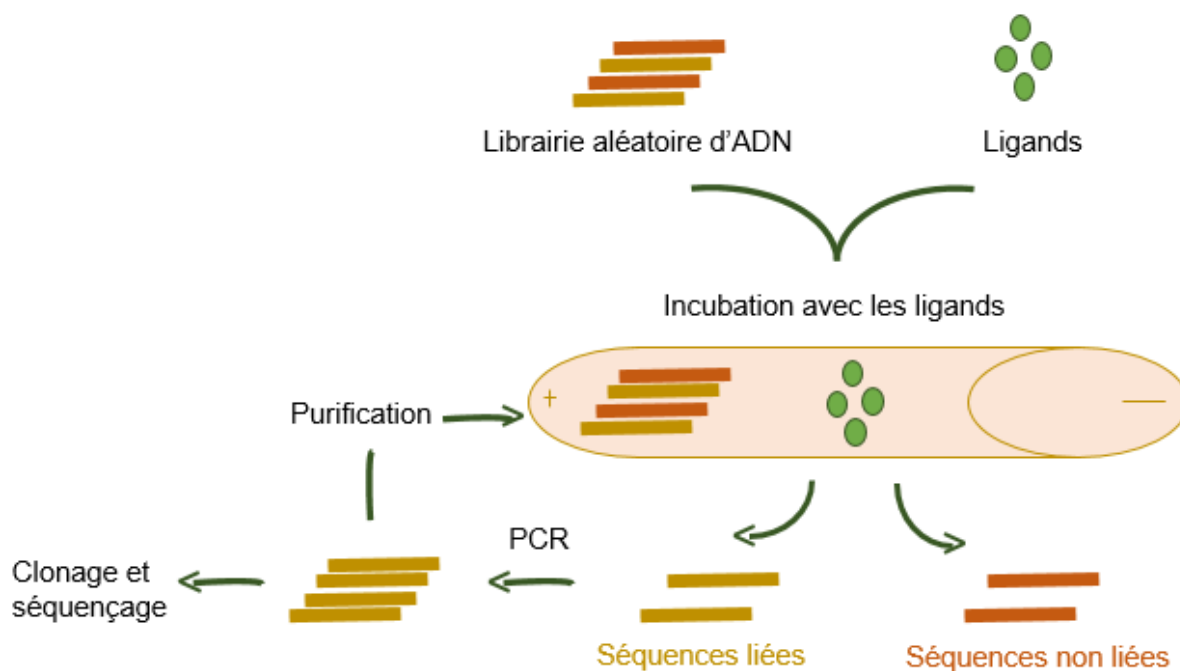


Figure 12: Représentation schématique du CE-SELEX. Adapté de (Mosing et al., 2005)

- **SELEX microfluidique (M-SELEX)**

Le SELEX Microfluidique ou M-SELEX, est une méthode qui intègre généralement des micro-billes avec des puces microfluidiques. Cette méthode représente un moyen efficace, pour le

criblage d'aptamères d'acides nucléiques. En comparaison avec les systèmes de SELEX traditionnels, les systèmes microfluidiques sont plus compacts et consomment moins d'échantillons. C'est une méthode qui peut considérablement accélérer la séparation des aptamères en utilisant un très petit nombre de molécules cibles pour obtenir une sélection dans de très strictes conditions (Lou et al., 2009). Cette technologie présente donc des avantages uniques dans l'amélioration de l'efficacité de criblage du SELEX conventionnel que ce soit en fixant les molécules cibles sur des micro-billes magnétiques (Cho et al., 2010) ou en encapsulant les cibles dans du gel (Bae et al., 2013) mais présente aussi des inconvénients comme le fait que les cibles doivent justement être immobilisées et que la technologie peut donner une faible pureté (Nur et al., 2021).

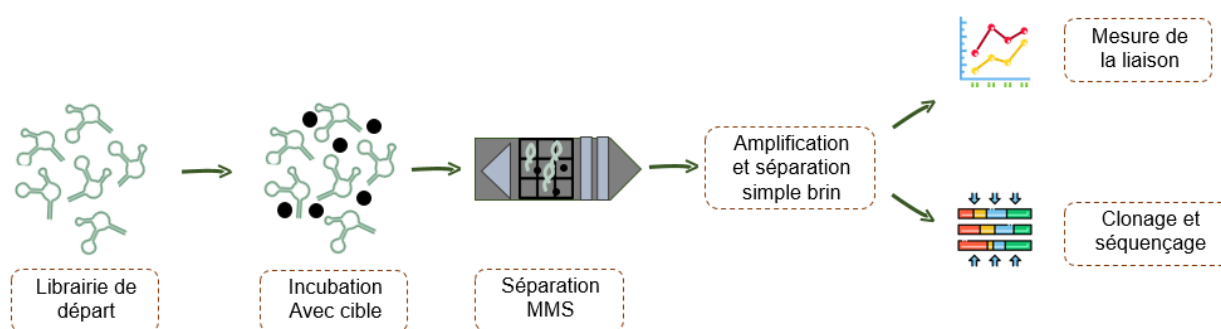


Figure 13: Représentation schématique du M-SELEX. Adapté de (Ahmad et al., 2011)

On incube la librairie de départ (1) avec des billes magnétiques enveloppées de la protéine cible (2). Le dispositif de séparation micro-magnétique (MMS) est ensuite utilisé pour attraper les billes et effectuer un lavage à haute stringence (3). Une PCR sera effectuée sur les billes éluées (4). La récupération du brin marqué par fluorescence a lieu (5), et sera par la suite utilisé pour les mesures de liaison (6), le clonage et le séquençage (7).

- **SELEX à cellule (Cell-SELEX)**

Le SELEX à cellule est une méthode de sélection utilisée pour découvrir de nouveaux biomarqueurs en criblant des aptamères spécifiques interagissant avec la surface cellulaire. Cette méthode a comme cible des cellules vivantes complètes et se compose de deux étapes principales: en premier lieu les cellules cibles sont incubées avec des oligonucléotides et subissent un criblage, en deuxième lieu, les cellules non-cibles subissent un dépistage négatif.

La méthode de SELEX à cellule présente plusieurs avantages grâce à la possibilité d'utiliser directement les aptamères de criblage pour identifier les cellules et effectuer les études de liaison cellulaire, mais aussi grâce à la possibilité d'effectuer un criblage simultané de plusieurs aptamères qui ciblent différentes molécules réceptrices se trouvant sur la surface de la cellule d'intérêt (Fang & Tan, 2010), mais en contre-partie elle nécessite plus de temps que le SELEX classique et nécessite une identification supplémentaire de la cible après le processus de SELEX, de plus la complexité de la cible complique aussi le processus du SELEX (Nur et al., 2021).

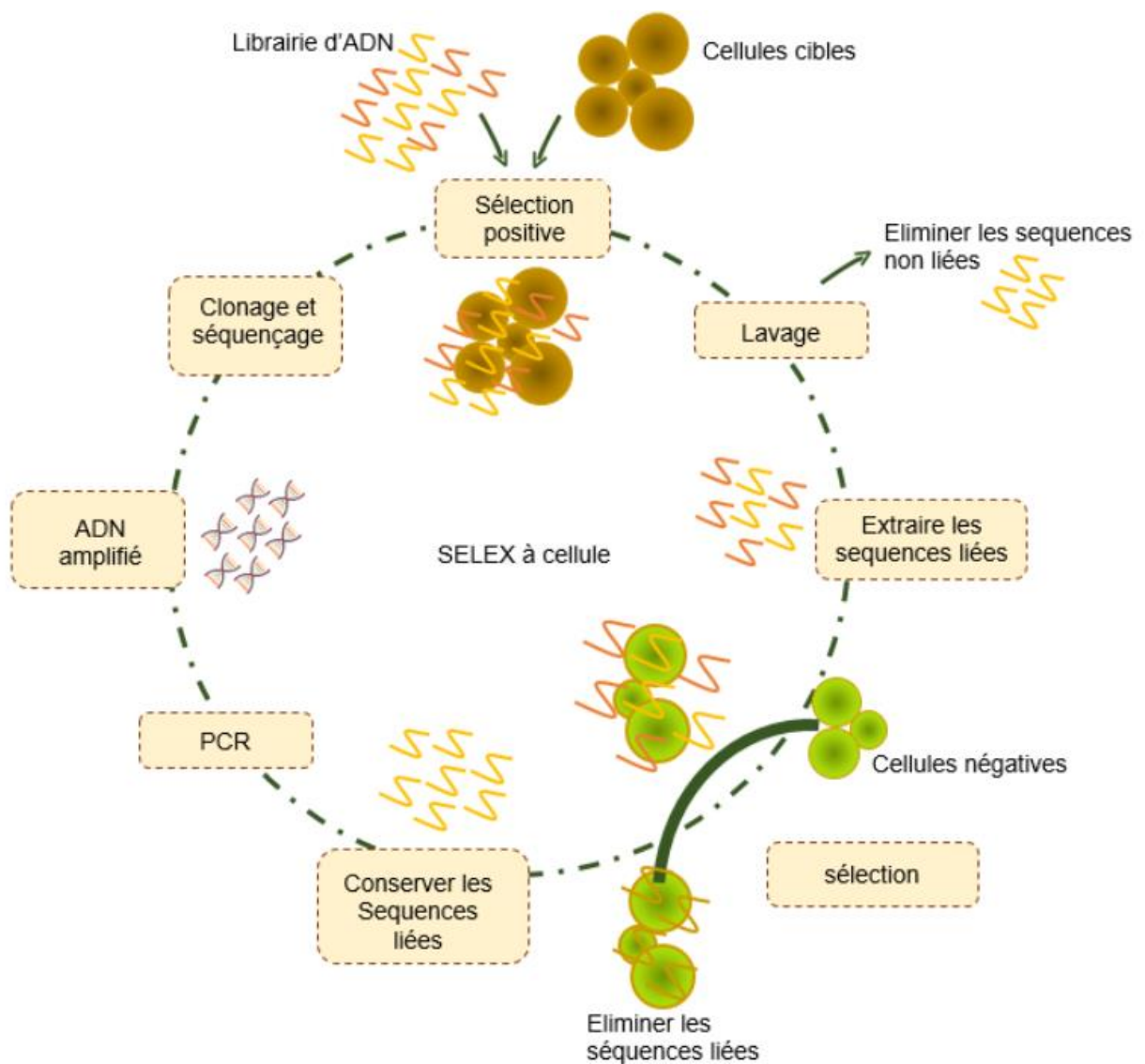


Figure 14: Représentation schématique du Cell-SELEX. Adapté de (Fang & Tan, 2010)

- **SELEX à base de filtration sur membrane de nitrocellulose**

La membrane de nitrocellulose est connue pour son affinité non spécifique pour les protéines, elle permet donc une immobilisation rapide et simple des protéines. Le groupe de Kramlova, a utilisé, en 1968, des membranes de nitrocellulose afin de séparer une protéine des molécules d'ARN (Pristoupil & Kramlová, 1968). Elle a par la suite été utilisée comme méthode de séparation des protéines de plusieurs autres composants pour pouvoir par la suite les immobiliser afin de réagir avec d'autres biomolécules. Néanmoins, ces membranes de filtration sont incapables de lier des peptides et des petites molécules ce qui représente une limite pour la méthode (Gopinath, 2007; Tombelli et al., 2005).

- **Capture-SELEX**

Puisque la plupart des méthodes rapportées ci-dessus présentent des limites d'utilisation avec les petites molécules, Stoltenburg et al. a mis en œuvre une méthode alternative de séparation, cette technique est appelée Capture-SELEX (Stoltenburg et al., 2012). Vu que l'immobilisation sur des surfaces solides de la cible, qui est une pratique fréquente lors de la sélection d'aptamères, est plus difficile à faire pour de petites molécules organiques, dans la méthode Capture-SELEX c'est la bibliothèque d'oligonucléotides qui est immobilisée sur des billes magnétiques grâce à une séquence d'hybridation fixe appelée séquence d'amarrage comprise dans la bibliothèque qui s'hybridera à une séquence complémentaire fixée sur des billes magnétiques (Stoltenburg et al., 2012).

Lors du contact avec le ligand cible, les oligonucléotides présentant une affinité élevée et une structure secondaire adaptée à la cible se libéreront des billes magnétiques et seront donc élus suite à cette liaison spécifique à la cible. L'avantage que présente l'utilisation des billes magnétiques dans cette méthode c'est la rapidité et la facilité de la séparation entre la librairie liée à la cible et les séquences non liées qui se trouvent sur les billes, ceci est fait grâce à un aimant (Joeng et al., 2009; Niazi et al., 2008; C. Wang et al., 2009).

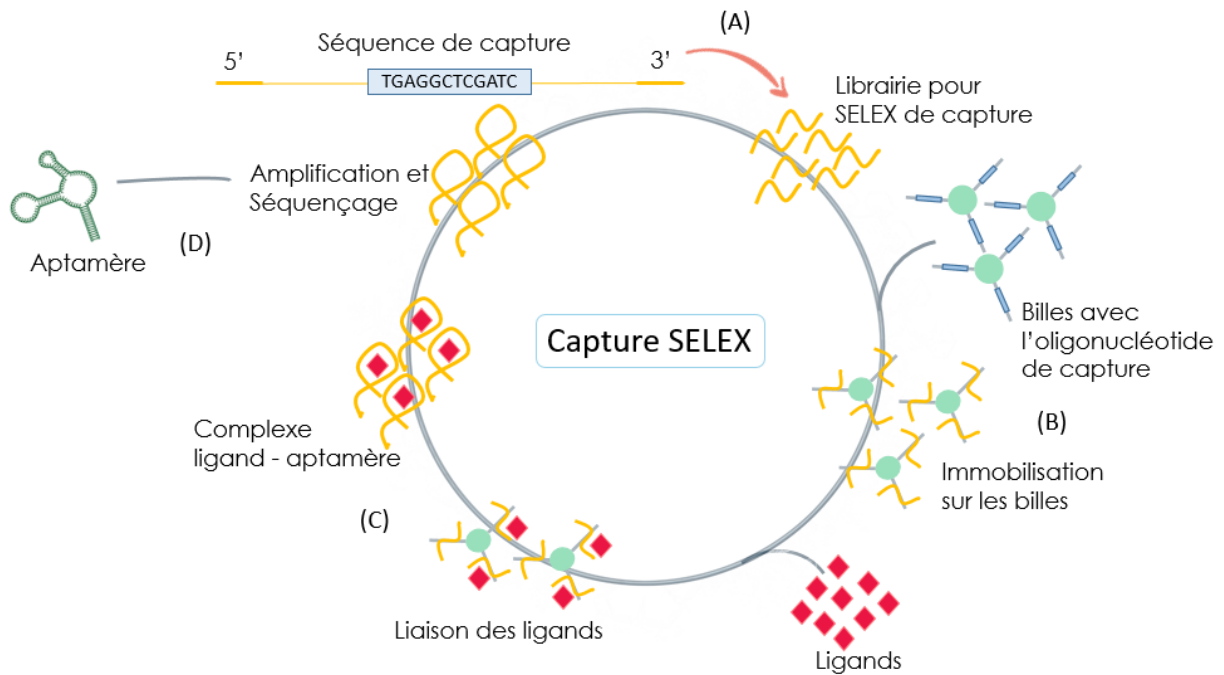


Figure 15: Représentation schématique de la librairie utilisée en Capture-SELEX.

(A) : Conception de la librairie, (B) : Immobilisation des séquences de la librairie sur des billes magnétiques NHS, (C) : Interaction de l'aptamère avec son ligand en se détachant des billes (D), séquençage et caractérisation des aptamères sélectionnés

- **SELEX basé sur d'autres méthodes**

De nombreuses autres techniques ont été utilisées avec la méthode de SELEX, telles que : Microscopie à force atomique (AFM), la résonance plasmonique de surface (SPR) et les tests de déplacement de mobilité électrophorétique (EMSA). Malgré l'avantage théorique que présentent ces méthodes par rapport à la réduction du nombre de tours de sélection, leur efficacité au niveau de la sélection des aptamères n'a pas été mise en évidence (Khatri et al., 2003; Misono & Kumar, 2005; K.-M. Song et al., 2012; Tsai & Reed, 1998).

2 PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

De nos jours, le développement de biocapteurs prend un grand essor, d'une part parce que le volet de la détection des particules biologiques a une grande importance dans plusieurs domaines différents (environnemental, pharmaceutique, agroalimentaire, etc.), et d'autre part grâce aux nombreux avantages que présentent les biocapteurs tels que la facilité, la sensibilité et la rapidité par rapport aux méthodes de détection traditionnelles.

Parmi les différents types de biocapteurs, il y a les aptasenseurs qui sont des biosenseurs dont la partie biocapteur est composée d'un aptamère qui lie une molécule cible d'une manière spécifique et avec une haute affinité. Ces aptamères peuvent être subdivisés en deux classes, selon qu'ils changent ou non de conformation au contact du ligand. L'utilisation des aptamères dans les biocapteurs est plus facile quand on utilise les aptamères qui changent de conformation, car on peut utiliser ce changement de conformation pour produire un signal détectable. Cependant, la majorité des aptamères publiés n'ont pas cette capacité de changer de conformation, ou du moins elle n'est pas connue ou caractérisée. Cela limite l'applicabilité de ces aptamères qui doivent être soumis à des étapes de design rationnel pour tenter de produire un changement de conformation adapté à certaines applications. La catégorie d'aptamères qui possède une capacité de changer de conformation lors de l'événement de reconnaissance, qui lui a une spécificité basée sur une complémentarité structurale et chimique entre les partenaires moléculaires, est très utile dans le domaine de développement de biocapteurs grâce à son potentiel à induire de fortes réponses analytiques qui facilitent nettement le développement des biocapteurs.

Pour y pallier, nous avons émis l'hypothèse que la modification des séquences d'une liste d'aptamères connus peut forcer un changement de conformation et donc faciliter l'utilisation de cet aptamère pour le développement de biocapteurs.

Pour répondre à notre hypothèse, trois objectifs ont été fixés :

1. La préparation d'une librairie d'aptamères modifiés en ajoutant des bases à des aptamères connus de la base de données « apta-index » pour qu'ils aient un potentiel de changement de conformation.
2. La sélection des aptamères qui changent de conformation au contact de leur ligand en utilisant des billes magnétiques NHS, avec la méthode de SELEX de capture.

3. L'optimisation de la méthode de sélection SR-PAGE :

La méthode de Shifted-Reverse PAGE (SR-PAGE) est aussi basée sur un changement de structure, elle peut donc être adaptée pour la sélection d'une librairie d'aptamères capables de changer de conformation. La méthode a donc été optimisée pour favoriser son utilisation dans le cadre d'un SELEX.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Conception de la librairie et des amorces pour le SELEX

3.1.1 Conception des aptamères modifiés à partir de la base de données Apta-index

Apta-index est une base de données contenant plus de 500 aptamères. Nous l'avons utilisée pour obtenir les séquences d'aptamères à tester, nous nous sommes intéressés aux 145 séquences d'aptamères ARN existant dans la base de données, et une autre étudiante s'est intéressée aux séquences d'ADN.

Afin de forcer un changement de conformation chez les aptamères de la librairie de base, des modifications ont été effectuées : Ceci est fait en ajoutant 5 nucléotides complémentaires à 5 nt de la séquence de l'aptamère, ce qui facilitera l'hybridation de ces parties complémentaires et donc avoir un certain potentiel de repliement alternatif qui sera défait lors de l'ajout du ligand. En d'autres mots, une séquence complémentaire qui, en présence de ligand, sera sujette à induire un changement de conformation et donc le changement de conformation. (Plus de détails sur les principes de conception de cette librairie sont fournis dans la partie « Résultats ».)

Tableau 3: Séquences utilisées pour la préparation de la librairie avec modifications

Nom	Type	Séquence 5'-3'
Pool	librairie	GGGAAGACATTATGTCCGAT- séquence d'Apta-index - TGAGGCTCGATC-5nt- AAACAAATAAAACAAATAAAACAAATAAAACAAATAAAACAAATAAAA A –GCGATCGCTAGGTCGGATGT
NAL003_ AptaT7_Fw	Amorce Fw	TAATACGACTCACTATAGGGAAGACATTATGTCCGAT
NAL002_ Apta_Rev	Amorce Rev	ACATCCGACCTAGCGATCGC

Les nucléotides de couleur rouge représentent la séquence promotrice de l'enzyme T7 ARN polymérase et les nucléotides de couleur bleue représentent la séquence de capture qui permettra à l'ARN de se fixer sur les billes magnétiques dans les prochaines étapes. La séquence de couleur orange est un exemple d'une séquence de remplissage qui sert à atteindre la taille 130nt fixée pour toutes les séquences, et la partie en vert représente les 5 nucléotides ajoutés à nos séquences et qui représente la modification effectuée.

Les séquences de la librairie utilisée contiennent la séquence de l'aptamère de base, les nucléotides ajoutés pour la modification et les amorces, la taille des séquences a été uniformisée à 130 nt pour homogénéiser l'ensemble des séquences et faciliter l'étape de vérification de l'amplification et/ou de la sélection. De plus, la plateforme de synthèse parallèle d'oligonucléotides requiert des séquences de tailles similaires et a une limite de 170 nt, ce qui revient à dire 130 nt fonctionnels plus deux séquences de 20 nt complémentaires aux amorces.

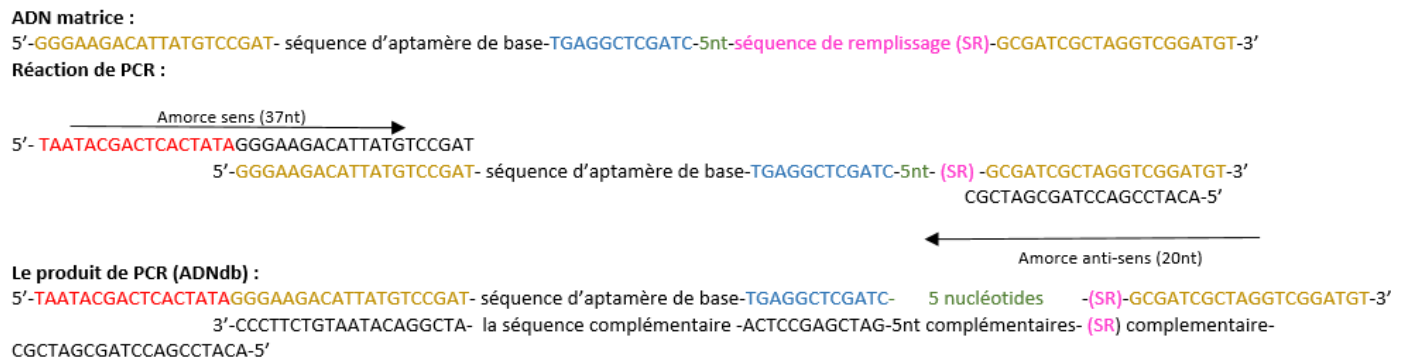


Figure 16: Conception de la librairie d'ADN pour le SELEX

Les nucléotides de couleur rouge représentent la séquence promotrice de l'enzyme T7 ARN polymérase et les nucléotides de couleur bleue représentent la séquence de capture qui permettra à l'ARN de se fixer sur les billes magnétiques dans les prochaines étapes. La séquence en vert représente les 5nt qu'on a ajoutés à la séquence. Les séquences en jaune représentent les régions fixes sur lesquelles les amorces se fixent. La séquence (SR) de couleur rose sert à atteindre la taille 130nt fixée pour toutes les séquences.

Les oligonucleotides réguliers sont commandés chez IDT DNA et la librairie de 1170 séquences d'ARN a été commandée chez Genscript qui permet la synthèse de librairies de milliers d'oligonucléotides d'une taille pouvant atteindre 170 bases grâce à la technologie de synthèse CMOS (Complementary metal oxide semiconductor).

Les séquences ajoutées ont une taille de 5nt et correspondent aux nucléotides complémentaires de la séquence de base, les 5nt en question ne sont pas fixes, c'est-à-dire que pour chaque séquence de notre librairie on a plusieurs design selon les différents 5nt complémentaires ajoutés. Cet ajout va, en quelque sorte, assurer le repliement de la séquence sur l'aptamère puisqu'il y a complémentarité entre les bases, et s'il y a affinité avec le ligand en question, c'est le dépliage de la séquence qui assurera le changement de conformation recherché.

3.1.2 Amplification de la librairie

La réaction de PCR a été faite dans des volumes réactionnels de 100 µl, les détails du protocole expérimental sont représentés ci-dessous (**Tableau 4**)

Tableau 4: Composition pour chaque tube et conditions de la PCR

ADN matrice	1 µl
Amorce FW (100 µM)	1 µl
Amorce REV (100 µM)	1 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
Tampon réactionnel de la Taq	10 µl
Enzyme Q5 (ADN polymérase de haute-fidélité)	1 µl
H2O milli Q	Qsp 100 µl

Etape		Température	Temps
Dénaturation initiale		95°C	3 minutes
34 cycles	Dénaturation	95°C	30 secondes
	Hybridation	T _m : 59.3°C	30 secondes
	Elongation	68°C	30 secondes
Elongation finale		68°C	5 minutes
Conservation		12°C	∞

La PCR a lieu dans le thermocycleur 'T100 Thermal Cycler Bio-Rad'. Les produits d'amplifications sont par la suite contrôlés par une électrophorèse sur gel d'agarose 2% et la visualisation du résultat de migration est faite par l'appareil « GelDoc XR+ with Image Lab™ Software Bio-Rad ».

3.1.3 Amplification d'une librairie mutagène

La réaction de PCR a été faite dans des volumes réactionnels de 100 µl, les détails du protocole expérimental sont représentés dans les tableaux suivants :

Tableau 5: Composition pour chaque tube et conditions de la PCR

ADN matrice	1 µl
Amorce FW (100uM)	1 µl
Amorce REV (100uM)	1 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
Taq Reaction Buffer	10 µl
Enzyme Taq (Taq DNA Polymerase, Sherbrook)	0.5 µl
H2O milli Q	Qsp 100 µl

Etape		Température	Temps
Dénaturation initiale		95°C	3 minutes
10 cycles	Dénaturation	95°C	30 secondes
	Hybridation	Tm : 59.3°C	30 secondes
	Elongation	72°C	30 secondes
Elongation finale		72°C	5 minutes
Conservation		12°C	∞

L'ajout de 1 µl de MnCl₂ (500 µM) dans chaque tube PCR

Etape		Température	Temps
Dénaturation initiale		95°C	3 minutes
30 cycles	Dénaturation	95°C	30 secondes
	Hybridation	Tm : 59.3°C	30 secondes
	Elongation	72°C	2 minutes
Elongation finale		72°C	5 minutes
Conservation		12°C	∞

La PCR a lieu dans le thermocycleur et est visualisée tel que décrit précédemment.

3.2 Sélection des aptamères qui présentent un changement de conformation par la méthode Capture SELEX

3.2.1 Transcription chaude

- **La transcription**

Après avoir synthétisé notre ADN par PCR, nous effectuons une transcription in vitro afin d'obtenir de l'ARN que nous allons utiliser par la suite comme librairie dans notre SELEX.

Pour être capable de détecter le résultat des générations de SELEX, il faut marquer les ARN par de l'UTP [³²P], pour ce faire on effectue une transcription chaude :

La réaction a lieu dans un volume de 100 μ l contenant 20 μ l du tampon de transcription 5X (400 mM HEPES-KOH pH 7,5, 120 mM $MgCl_2$, 200 mM DTT, 10 mM spermidine), 20 μ l du produit PCR, 2 mM des ribonucléotides (rNTPs) (A, C, G), 0,8 mM de rUTP, 0.75 pmol de ^{32}P -alpha-UTP, 1 U/ μ l d'ARN polymérase T7, 1 U/ μ l d'inhibiteur des RNases (NEB), 1 U/ μ l pyrophosphatase (Sigma Aldrich, USA) pour dégrader les pyrophosphates qui sont des produits secondaires de la réaction, et le volume final est ajusté avec de l'eau milli-Q stérile. Le mélange est incubé à 37°C pendant 3 heures. Par la suite, 1 μ l de DNase (RNase free, NEB) est ajouté pour dégrader la matrice d'ADN pendant 30 min à 37°C.

- **Précipitation des produits de transcription**

Pour précipiter les ARN, 0.1 volume d'une solution de sodium acétate (3 M, pH 5,2) et 2.5 volume d'éthanol 100% sont rajoutés à chaque produit de transcription et ils sont placés 2 heures (ou plus) à - 80°C. Ensuite une centrifugation à 14000 rpm (rotations par minute) pendant 30 min est appliquée pour faire précipiter l'ARN au fond du tube, le surnageant est jeté et le culot est lavé avec 500 μ l d'éthanol 70%, suivi d'une centrifugation pendant 15 min à 14000 rpm. Finalement, le surnageant est jeté et l'ARN contenu dans le culot est laissé pour sécher pendant 20 minutes. L'ARN est ensuite resuspendu dans 20 μ l de H_2O , cette étape est faite sur glace pour préserver les ARN de la dégradation.

- **Electrophorèse sur gel de polyacrylamide**

Pour vérifier la taille des ARN et/ou les purifier, une migration sur gel de polyacrylamide dénaturant a été faite. Après centrifugation et séchage, à chaque échantillon d'ARN on ajoute un volume égal (20 μ l) de tampon de chargement dénaturant 2X (0.3% bleu de bromophénol, 0.3% bleu de xylène cyanol, 12 mM EDTA dans du formamide). Les échantillons ont été chargés sur un gel de polyacrylamide dénaturant 6%: 12 ml d'acrylamide 20% (avec un ratio 19 :1 acrylamide:bisacrylamide, Tris Borate EDTA 1X [TBE] [89 mM Tris pH 7,6, 89 mM acide borique, 2 mM EDTA] et urée 8M) et dilué dans 28 ml d'une solution de 8M urée, TBE 1X. Pour la polymérisation, 16 μ l de tetra méthyl ethylène diamine (TEMED) et 320 μ l d'ammonium persulfate (APS) 10% ont été ajoutés pour assurer la polymérisation. La migration a été faite dans du TBE 1X avec une puissance de 16 watts pendant 1 heure. Après la migration une plaque phosphore (storage phosphor screen, Molecular Dynamics) a été exposée au gel pendant 15 min, puis scanné par un Typhoon FLA 9500 (GE healthcare Life Sciences). La photo du gel a été imprimée à la même grandeur du gel ce qui nous permet de localiser le positionnement de l'ARN sur l'image imprimée du gel et de couper de la bande correspondante à la bonne taille de l'ARN. L'ARN a

été élué toute la nuit dans 500 µl de tampon d'éluion (EDTA 0,1 mM, NaCl 0,3 M, SDS 0,001%) à 4 °C en rotation puis précipité par l'éthanol 100 % et l'acétate de sodium toute la nuit à -80 °C comme décrit dans la section précédente.

3.2.2 Immobilisation de l'oligonucléotide de capture sur les billes magnétiques

Pour immobiliser notre oligonucléotide de capture (tableau 7) sur les billes magnétiques NHS, on a effectué des tests d'optimisation pour trouver la concentration adéquate pour la fixation, une solution contenant l'oligonucléotide de capture (2 µM) et les billes magnétiques à une concentration de 3% (NHS Modified Beads 500 nm, Galenvs) pour une mise en contact en rotation à température ambiante pendant 1 heure en agitant chaque 15 minutes. Ensuite, le tube est placé dans un support magnétique pour immobiliser les billes sur la paroi du tube et deux lavages sont effectués avec une solution de couplage (0.1 M NaHCO₃, pH 8.3 contenant 0.5 M NaCl). Les billes sont par la suite incubées avec une solution de blocage (0.1 M Tris/HCl, pH 8.0) en rotation à température ambiante pendant 1 heure, un lavage avec une solution Tris HCl (0.1 M Tris/HCl, 1 M NaCl, pH 8.0) est effectué, suivi d'un lavage avec une solution acétate (0.1 M acetate buffer, 1 M NaCl, pH 4) et pour finir on resuspend nos billes dans 1 ml du tampon SELEX (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ et 10 mM HEPES) et on stocke à 4°C.

Tableau 6: La séquence de capture

Nom	Séquence 5'-3'
NAL_004_capture_oligo	Amine – AAAGATCGAGCCTCA – Cy5

L'ajout d'une amine en position 5' permet la fixation de la séquence sur les billes NHS, et l'ajout du marqueur fluorescent Cy5 permet la visualisation par la suite

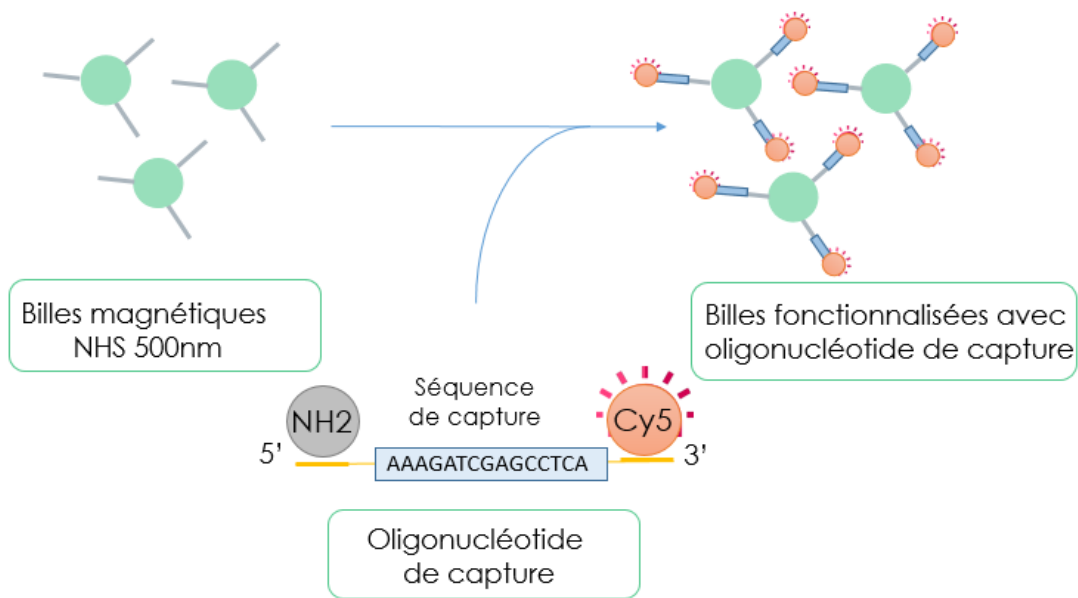


Figure 17: Représentation schématique de la fixation de l'oligonucléotide de capture sur les billes magnétiques

La vérification du bon fonctionnement de cette étape a été effectuée grâce au microscope Zeiss Axio Observer 7 (Caméra AxioCam 512).

3.2.3 Immobilisation de l'ARN sur l'oligonucléotide de capture

Une fois que l'oligonucléotide de capture est fixé sur les billes, il permet une interaction entre les billes et les ARN. Afin d'immobiliser les ARN (qui contiennent tous une séquence complémentaire à l'oligonucléotide de capture) sur les billes magnétiques couvertes de l'oligonucléotide de capture, une incubation en rotation à température ambiante pendant 30 minutes est faite, le surnageant contenant l'ARN non lié est par la suite retiré en plaçant le tube sur le support magnétique pendant 30 secondes.

Ensuite, 400 μ l du Tampon de SELEX (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ et 10 mM HEPES) pour le tour 1 et 200 μ l pour le reste des tours sont ajoutés aux billes et une incubation pendant 5 minutes à 30°C sur un thermobloc est effectuée pour éliminer les liants faibles en retirant le surnageant. Suivi de l'ajout des mêmes proportions du Tampon de SELEX, mais avec une incubation en rotation pendant 5 minutes à température ambiante et une élimination du surnageant.

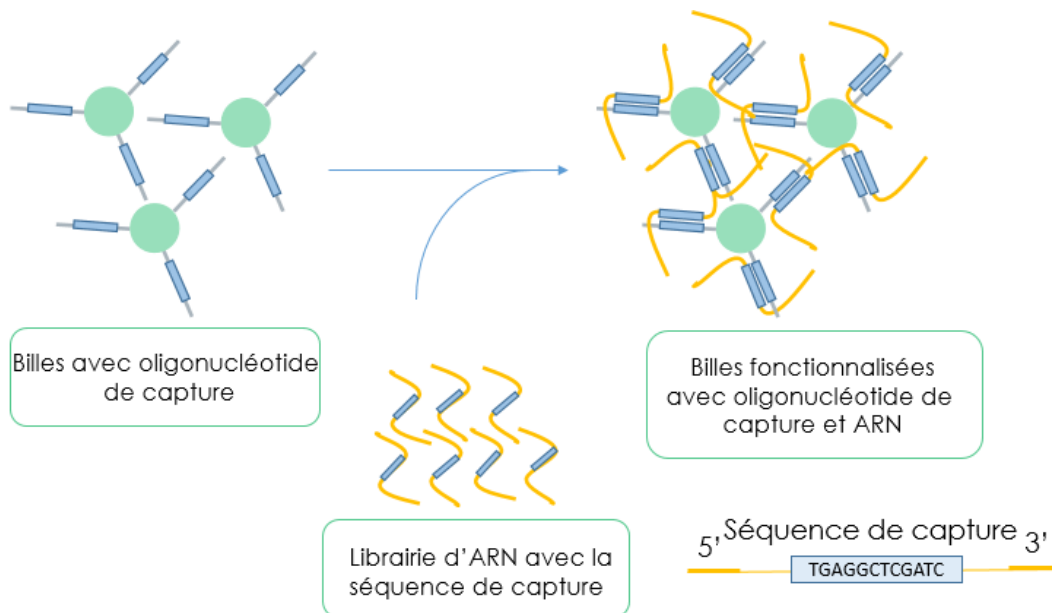


Figure 18: Représentation schématique de la fixation de la librairie sur les billes via l'hybridation à l'oligonucléotide de capture

Afin de déterminer la concentration adéquate des billes à utiliser dans cette étape nous avons testé différentes concentrations de billes allant de 1 nM à 1 μ M, et nous avons par la suite déposé 2 μ l de chaque solution de billes avec l'ARN fixé dessus, de surnageant, des deux lavages sur un papier Whatman, et ce pour les différentes concentrations de billes testées. Le papier séché et enveloppé est exposé dans une plaque au phosphore pendant 4 heures. La lecture de la plaque se fait grâce à l'appareil Typhoon FLA 9500 et c'est le logiciel ImageQuant qui nous permet de quantifier l'intensité de radioactivité de chaque tache (spot) déposée sur le papier afin de trouver la concentration des billes adéquate.

3.2.4 Processus de sélection in vitro

Au cours de chaque cycle de SELEX (tel que schématisé à la figure 14), l'ARN fixé sur les billes est incubé avec 400 μ l du tampon de SELEX pour la génération 1 et 200 μ l pour le reste des générations de SELEX, de la solution contenant les ligands pendant une heure ou 30 min à température ambiante sous une douce agitation, le surnageant contenant les aptamères élués est par la suite récupéré en plaçant le tube sur le support magnétique pendant 30 secondes comme décrit dans la section précédente et transféré dans un tube de 1.5 ml pour une précipitation comme décrite précédemment.

Les billes restantes avec les ARN immobilisés, mais non élués après l'addition de la solution contenant les cibles, sont remises en suspension dans 200 µl de tampon SELEX pour des fins de vérification. (Lauridsen et al., 2018).

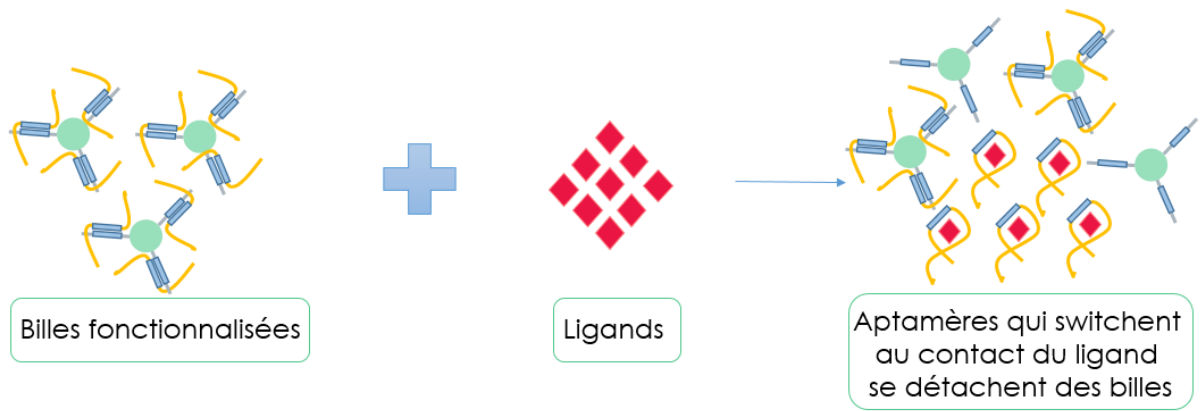


Figure 19: Représentation schématique du comportement de la librairie d'ARN au contact avec les ligands

Pour les générations de SELEX 1 et 2, un ensemble de ligands a été sélectionné correspondant à certains aptamères se trouvant dans notre librairie. L'ensemble de ligands se compose de petites molécules organiques (ex : acides aminés), d'une protéine et d'ions métalliques. Le choix des ligands en question a été basé sur la disponibilité au laboratoire afin de pouvoir effectuer ces essais pour faire la preuve de concept avant de passer à l'utilisation de ligands qui sont assez coûteux. Pour les générations de SELEX 3 et 4, ce même ensemble de ligands a été divisé en deux groupes différents et chaque groupe a été testé en présence et absence de glutathion qui est connu pour empêcher la chélation des ions métalliques et les garder sous leur forme réduite. Le temps d'incubation est de 60 min.

Tableau 7: Les ligands utilisés pour les générations de SELEX

générations	Génération 1 et 2	Génération 3 et 4			
groupe	Tous	1	2	3	4
Ligands utilisés	L-Isoleucine L-Histidine L-Arginine Tétracycline Lysozyme Chloramphénicol ATP TPP Manganèse Nickel Zinc	L-Isoleucine L-Histidine L-Arginine Tétracycline Lysozyme Chloramphénicol ATP TPP	Manganèse Nickel Zinc	L-Isoleucine L-Histidine L-Arginine Tétracycline Lysozyme Chloramphénicol ATP TPP	Manganèse Nickel Zinc
glutathion		+	-	+	-

Les générations d'aptamères exposés au glutathion ont été effectuées car le mix de ligands utilisé contient des ions métalliques et le glutathion est connu pour empêcher la chélation des ions métalliques et les garder sous leur forme réduite.

3.2.5 Réaction RT-PCR

- **Principe**

La synthèse d'ADN est catalysée par des transcriptases inverses (*reverse transcriptase*, RT). Ces enzymes sont des ADN polymérases ARN dépendantes, utilisant un brin d'ARN comme matrice pour synthétiser un brin d'ADN complémentaire. Cela correspond effectivement à l'«inverse» d'une réaction de transcription de l'ADN en ARN. Les transcriptases inverses sont issues de rétrovirus.

- **Transcription inverse**

Le kit RT 'Promega' a été utilisé pour la transcription inverse de l'ARN en ADN simple brin. L'ARN a été incubé pendant 5 minutes à 70°C en présence de 1 µl de l'amorce Reverse (100µM) puis placé pendant 5 minutes dans la glace. Le mélange réactionnel a été préparé comme suit : (tampon RT 1X, dNTP (1.5 mM), MgCl₂ (2.5 mM) et de la reverse transcriptase (200 U/µl)) dans un volume final de 20 µl. La réaction a été par la suite lancée dans le thermocycleur 'T100 Thermal Cycler Bio-Rad' selon le programme comme suit : un cycle à 25°C pendant 5 min, un cycle à 42°C pendant 60 min et un cycle à 70°C pendant 15min.

- **Amplification des séquences par PCR**

Une PCR classique a été réalisée. Elle a été faite dans des volumes réactionnels de 100 µl, les détails du protocole sont représentés dans le **tableau 8**.

Tableau 8: Composition pour chaque tube et conditions de la PCR

ADN matrice	15 µl
Amorce FW (100 µM)	1 µl
Amorce REV (100 µM)	1 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
Tampon réactionnel de la Taq	10 µl
Enzyme Taq (Taq DNA Polymerase, Sherbrooke)	1 µl
H2O milli Q	Qsp 100 µl

3.2.6 Test d'affinité des générations

Un test d'affinité pour les générations de SELEX est effectué grâce au marquage ³²P de nos ARN. Cette étape a lieu dans le but d'évaluer l'enrichissement et l'affinité des générations de SELEX, pour ce faire, 3 µl de chaque solution d'ARN élué, de surnageant, de lavage et d'ARN non élué

collé sur les billes magnétiques, sont déposés sur un papier Whatman. Le papier séché et enveloppé est exposé dans une plaque au phosphore pendant 4h.

Etape		Température	Temps
Dénaturation initiale		95°C	3 minutes
34 cycles	Dénaturation	95°C	30 secondes
	Hybridation	Tm : 59.3°C	30 secondes
	Elongation	72°C	30 secondes
Elongation finale		72°C	5 minutes
Conservation		12°C	∞

La lecture de la plaque se fait grâce à l'appareil Typhoon FLA 9500 et c'est le logiciel ImageQuant qui nous permet de quantifier l'intensité de radioactivité de chaque tache (spot) déposée sur le papier par rapport à l'intensité de la totalité des taches et par rapport au bruit de fond selon la formule suivante : $(\text{intensité de la tache éluée} - \text{blanc}) / [(\text{intensité de la tache éluée} + \text{intensité de la tache surnageant} + \text{intensité de la tache lavage} + \text{intensité de la tache billes}) - 3 \times \text{blanc}]$.

3.2.7 Séquençage à haut débit

Un séquençage à haut débit Illumina MiSeq des générations du SELEX est réalisé afin d'identifier les potentielles séquences d'aptamères. Pour ce faire, 10 µl de chaque produit de PCR est envoyé au Centre d'innovation Génome Québec afin d'analyser des milliers de séquences. L'analyse des résultats de séquençage se fait par la suite par le programme Aptasuite dédié au SELEX (Hoinka et al., 2018), il permet d'aligner les différentes séquences afin de déterminer leur abondance dans chaque génération.

3.2.8 Séquençage Sanger

Cette méthode de séquençage nous permet d'identifier la séquence de quelques clones isolés. Afin de réaliser ce séquençage, nous avons cloné notre insert avec le kit « pGEM-T Easy vector » (Promega) selon les instructions du manufacturier, puis nous avons transformé des cellules compétentes E. coli DHα5 (*Molecular Cloning Technical Guide*, s. d.). Suite à une sélection bleu-blanc, les colonies blanches sélectionnées ont été cultivées en bouillon pour faire des « minipreps » de plasmide avec le kit « Presto™ Mini Plasmid » (Geneaid) selon les instructions du manufacturier. Le séquençage a été effectué au Centre d'innovation Génome Québec avec les amorces présentées dans **tableau 9**.

Tableau 9: Séquences des amorces utilisées lors du séquençage Sanger

Nom	Séquence 5'-3'
EB088_pgemt_F	AATTGGGCCCGACGTCGCAT
EB089_pgemt_R	TTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGG

3.2.9 Test de spécificité avec des aptamères individuels

Afin de vérifier la spécificité des aptamères et suite aux résultats de séquençages nous avons effectué un test de spécificité pour tester des séquences individuellement

- **Le principe de la PCR d'assemblage**

La synthèse d'une partie des séquences candidates de taille supérieure à 90 pb (les aptamères correspondants à la L-arginine, aux lysozymes et aux ions) a été effectuée par une PCR d'assemblage en utilisant des amorces chevauchantes. Cette méthode permet de synthétiser l'ADN et de l'amplifier afin de pouvoir l'utiliser ensuite comme matrice pour la transcription. La conception des amorces a été réalisée par le site « Primerize »(Tian et al., 2015) en ajoutant la séquence promotrice de l'enzyme T7 ARN polymérase : TTCTAATACGACTCACTATA à l'amorce de l'extrémité 5' suivie immédiatement d'un à trois résidus G, ce qui favorise des rendements de transcription robustes.

Son principe se base sur le fait d'assembler un grand fragment d'ADN à partir de fragments plus courts, via l'hybridation partielle des oligonucléotides simple brin utilisés, ce qui nous permet d'obtenir un « gène » synthétique (**figure 20**).

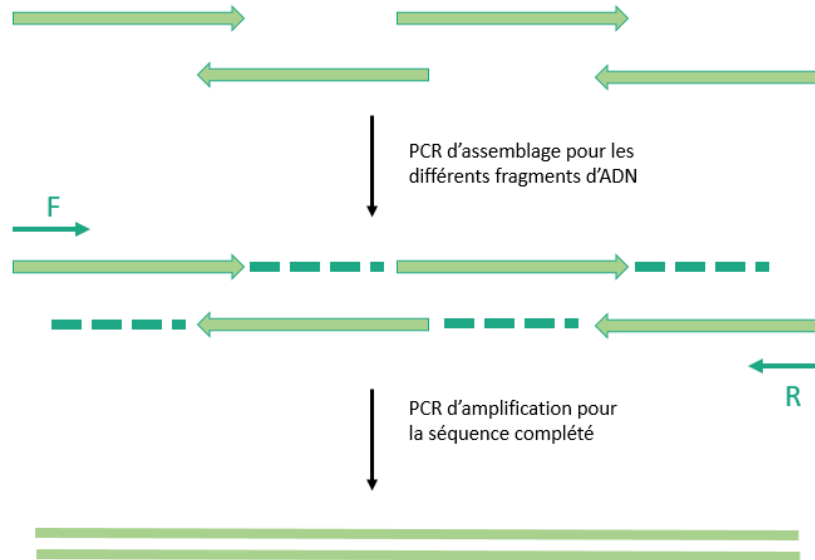


Figure 20: Principe de la PCR d'assemblage

La méthode PCR d'assemblage pour la construction de molécules d'ADN longues. Dans la première étape de la PCR, plusieurs oligonucléotides se chevauchant sont utilisés pour produire une molécule d'ADN pleine longueur. En plus du produit de pleine longueur, il en résulte des molécules plus courtes. Dans la deuxième étape de PCR, la molécule pleine longueur souhaitée est amplifiée sélectivement à partir du mélange à l'aide d'amorces spécifiques pour les extrémités du produit souhaité.

Tableau 10: Les différentes amorces utilisées pour l'assemblage PCR pour le test de spécificité

Aptamère	Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')
L-Arginine	NAL_Arginine_pool_FW1	TAATACGACTCACTATAAGGGAAGACATTATGTCCGATGGAGCTCAG CCTT
	NAL_Arginine_pool_REV1	CGCCAGCATCGGTTTATCATGCAGTGAAGGCTGAGCTCCATCGG AC
	NAL_Arginine_pool_FW2	CCGATGCTGGGCGATTCTCCTGAAGTAGGGGAAGAGTTGTCA
	NAL_Arginine_pool_REV2	CGTGGTGCCCCCATAACATGACAACCTCTTCCCCTACTT
	NAL_Arginine_pool_FW3	TGGGGGCACCACGGTCGGATCCTGTGAGGCTCGATCCATACAAAC AAAAT
	NAL_Arginine_pool_REV3	ACATCCGACCTAGCGATCGCTTTTTTTATTTTGTGGTATGGATCGA GCCTCACA
Manganèse Nickel Zinc	NAL_Ions_pool_FW1	TAATACGACTCACTATAAGGATAATAGCCGTAGGTT
	NAL_Ions_pool_REV1	GATCATCTGCGCTACGGCTTTGGCTTTCTCATCAGGGTTCGCTTTTCG CAACCTACGGCTAT
	NAL_Ions_pool_FW2	CCGTAGCGCAGATGATCTCGCCATCAGTACCGAAACGGTAGCGAG AGCTCTGAGGCTCGA
	NAL_Ions_pool_REV2	ACATCCGACCTAGCGATCGCTTTTTTTATTTTGTGGTATGGATCGA GCCTCAGAGCTCTC
	NAL_Chloramphénicol_FW1	TAATACGACTCACTATAAGGGAAGACATTATGTCCGATGG

Chloramph -énicol	NAL_Chloramphén icol_REV1	GTGTGACATTCACACGTCTTTTTTCACTGTGATCCCATCGGACATA ATGTCTTCC
	NAL_Chloramphén icol_FW2	AGACGTGTGAATGTCACTGAAAAAAGATCCCTGAGGCTCGATC TGTGAAAAAAGAG
	NAL_Chloramphén icol_REV2	CGATTTTTTACATGTTTTTTGAGACGTTTTTCTCGAGCTTTTTTCA CAGATCGAGCC
	NAL_Chloramphén icol_FW3	CGTCTCAAAAAACATGTAAAAAATCGATAAAAAACATATGAAAAAGC GATCGCTAGGT
	NAL_Chloramphén icol_REV3	ACATCCGACCTAGCGATCGCTTTTTTCAT
NAL003_ AptaT7_Fw	Amorce Fw	TAATACGACTCACTATA GGGAAGACATTATGTCCGAT
NAL002_ Apta_Rev	Amorce Rev	ACATCCGACCTAGCGATCGC

Les nucléotides de couleur rouge représentent la séquence promotrice de l'enzyme T7 ARN polymérase. Les nucléotides de couleur bleue correspondent aux résidus guanine (le nucléotide à partir duquel l'enzyme commence à transcrire le brin matrice).

Par la suite, nous avons prélevé 3 µl de chaque solution d'ARN élué, de surnageant, de lavage et d'ARN non élué collé sur les billes magnétiques, que nous avons déposé sur un papier Whatman, que nous avons séché, enveloppé et exposé pendant 4h dans une plaque phosphore.

3.2.10 Le « in-line probing »

Cette méthode nous permet d'élucider les capacités de liaison des aptamères aux ligands testés et de déterminer leur Kd en exploitant le fait que la structure de l'ARN influence sa tendance naturelle à se dégrader (Regulski & Breaker, 2008). Cette méthode passe par plusieurs étapes dont la PCR d'assemblage pour synthétiser l'ADN, la transcription in vitro pour obtenir l'ARN correspondant, le marquage radioactif par le ³²P et pour finir la réaction d'in-line qui nous permettra de caractériser les interactions entre les aptamères et les ligands testés.

Le **tableau 11** présente les amorces utilisées pour l'amplification par PCR d'assemblage de chaque séquence d'aptamère

Tableau 11: Les différentes amorces utilisées pour la PCR d'assemblage

Aptamère	Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')	
L-Arginine	NAL_Arginine_FW1	TAATACGACTCACTATAGGAGCTCAGCCTTCACTGCATGATAA ACCGATGCTGGGCG	
	NAL_Arginine_REV1	CTTCCCCTACTTCAGGAGAATCGCCCAGCATCGGTTT	
	NAL_Arginine_FW2	TTCTCCTGAAGTAGGGGAAGAGTTGTCATGTATGGGGGCA	
	NAL_Arginine_REV2	CAGGATCCGACCGTGGTGCCCCCATAACATGACAA	
	NAL_Arginine_F	TAATACGACTCACTATAGGAGCTCAGCC	Tm : 68 °C
	NAL_Arginine_R	CAGGATCCGACCGTGGT	
Manganèse Nickel Zinc	NAL_Ions_FW1	TAATACGACTCACTATAGGATAATAGCCGTAGGTT	
	NAL_Ions_REV1	CAGGGTCGCTTTCGCAACCTACGGCTATTATCCTATAGTG	
	NAL_Ions_FW2	GCGAAAGCGACCCTGATGAGAAAGCCAAAGCCGTAGCGCAGA	
	NAL_Ions_REV2	GAGCTCTCGCTACCGTTTCGGTACTGATGGCGAGATCATCTG CGCTACGGCTTTG	
	NAL_Ions_F	TAATACGACTCACTATAGGATAATAGCC	Tm : 63°C
	NAL_Ions_R	GAGCTCTCGCTACCGTTTC	
	NAL_Lysozyme_FW	TAATACGACTCACTATAGGGAATTGATCCACATCTACGAATTCA TCAGGGCTAAAGAGTG	

Lysozyme	NAL_Lysozyme_REV	AAGCTTCGTCAAGTCTGCAGTGAAGTAACTCTGCACTCT TTAGCCCTGATGAATT	
	NAL_Lysozyme_F	TAATACGACTCACTATAGGGAATTG	T _m : 62°C
	NAL_Lysozyme_R	AAGCTTCGTCAAGTCTGCAG	

Les nucléotides de couleur rouge représentent la séquence promotrice de l'enzyme T7 ARN polymérase. Les nucléotides de couleur bleue correspondent aux résidus guanine (le nucléotide à partir duquel l'enzyme commence à transcrire le brin matrice).

La réaction de PCR d'assemblage a été faite dans des volumes réactionnels de 100 µl, les détails du protocole expérimental sont représentés dans le **tableau 12**.

Tableau 12: Composition pour chaque tube et conditions de la PCR

Chaque amorce	1 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
Taq Reaction Buffer	10 µl
Enzyme Taq (Taq DNA Polymerase, Sherbrook)	1 µl
H2O milli Q	Qsp 100 µl

Etape		Température	Temps
Dénaturation initiale		95°C	15 minutes
30 cycles	Dénaturation	95°C	30 secondes
	Hybridation	50°C à 68°C	30 secondes
	Elongation	72°C	1 minute
Elongation finale		72°C	10 minutes
Conservation		12°C	∞

Pour le reste des séquences d'aptamères (< 90 Pb) nous avons effectué une extension d'amorces avec l'amorce de la T7 et la séquence inverse complémentaire de notre aptamère. Les séquences et l'amorce utilisées sont détaillées dans le **tableau 13**.

Tableau 13: Les différentes séquences utilisées pour la Primer extension

Aptamère	Séquence (5'-3')
L-Isoleucine	GGTCTCCCAATAGTCGCGAACGACGTAAGACCTATAGTGAGTCGTATTA
L-Histidine	GGCATCGCCTGTTACTTACATCAACCCACTTTCCGATGCCTATAGTGAGTCGTATTA
Tétracycline	ACCGGCCTAGGTGGTTCGAATTCTTCACCTCTCCAGATCGAAATCTGGTATGTTT TAGGCCTATAGTGAGTCGTATTA

Chloramphénicol	GGGATCTTTTTTCAGTGTGACATTACACGTCTTTTTTCACTGTGATCCCTATAG TGAGTCGTATTA
ATP	GGGTTGCTGGCACCGAAGTGCCACAGTTTCTTCCCAACCCTATAGTGAGTCGTA TTA

Tableau 14: L'amorce utilisée pour l'extension d'amorces

L'amorce	Séquence (5'-3')
T7GG	TAATACGACTCACTATAGG

La réaction a été faite dans des volumes réactionnels de 100 µl, les détails du protocole expérimental sont représentés dans le **tableau 15**.

Tableau 15: Composition pour chaque tube et conditions de la PCR

L'amorce T7	1 µl
Template	1 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
Taq Reaction Buffer	10 µl
Enzyme Taq (Taq DNA Polymerase, Sherbrook)	1 µl
H2O milli Q	Qsp 100 µl

Etape		Température	Temps
Dénaturation initiale		95°C	15 minutes
30 cycles	Dénaturation	95°C	30 secondes
	Hybridation	49°C	30 secondes
	Elongation	72°C	1 minute
Elongation finale		72°C	10 minutes
Conservation		12°C	∞

3.2.10.2 Transcription in vitro

Après avoir synthétisé notre ADN par PCR d'assemblage, nous effectuons une transcription in vitro afin d'obtenir de l'ARN que nous allons utiliser par la suite dans la réaction de « in-line probing ». La réaction a lieu comme décrit dans la partie 3.2.1 mais avec 3 mM de chaque rNTP et sans ³²P-UTP dans un volume de 100 µl.

- **Purification des ARN**

Comme décrit dans la partie 3.2.1 mais après migration, la visualisation est faite en exposant le gel à une lampe UV pour faire ombrage sur une plaque de silice et chaque bande qui correspond à l'ARN recherché (qui fait une ombre) est coupée et éluée.

3.2.10.3 Déphosphorylation des ARN

Cette étape est nécessaire pour pouvoir marquer l'ARN en 5'. La réaction a lieu dans un volume final de 20 µl contenant 10 µl d'ARN transcrit et purifié, 1 µl d'enzyme *antarctic phosphatase* 5U/µl (NEB), 2 µl de tampon 10X de l'enzyme, 0.5 µl d'inhibiteur des RNases et 6.5 µl d'eau stérilisée RNase free. On incube la solution à 37°C pendant 20 minutes on réalise ensuite une incubation à 65°C pendant 5 minutes pour inactiver l'enzyme.

3.2.10.4 Marquage radioactif des ARN

Cette étape est nécessaire pour pouvoir marquer l'ARN en 5'. La réaction a lieu dans un volume final de 20 µl contenant 10 µl d'ARN transcrit et purifié, 1 µl d'enzyme *antarctic phosphatase* 5U/µl (NEB), 2 µl de tampon 10X de l'enzyme, 0.5 µl d'inhibiteur des RNases et 6.5 µl d'eau stérilisée RNase free. On incube la solution à 37°C pendant 20 minutes on réalise ensuite une incubation à 65°C pendant 5 minutes pour inactiver l'enzyme.

- **Purification de l'ARN**

Elle a lieu sur gel de polyacrylamide 6% telle que décrite précédemment. On ajoute 20 µl de tampon de chargement dénaturant 2X (DYE) à notre échantillon pour arrêter la réaction, on dépose les 40 µl et on fait migrer le gel pendant 1h à 700 V, par la suite on le démoule et on l'expose pendant 5 minutes sur une plaque phosphore (storage phosphor screen, Molecular Dynamics) par la suite la plaque est scannée par le Typhoon FLA 9500 (GE healthcare Life Sciences). Les bandes de l'ARN radio-marqué sont coupées et éluées dans le tampon d'éluion 2 heures à température ambiante ou toute une nuit à 4°C.

- **Précipitation de l'ARN radio-marqué**

On récupère l'ARN grâce à une seringue dans laquelle on dépose de la laine de verre et 800 µl de billes G25 sephadex. L'ARN récupéré est précipité toute la nuit à -20°C en ajoutant 1/10e du volume d'acétate de sodium 3 M et 2,5 V d'éthanol 100%. L'échantillon est ensuite récupéré par centrifugation de 30 minutes à 14000 rpm à 4°C. Puis, 500 µl d'éthanol 70% sont ajoutés sur le

culot suivis d'une centrifugation de 10 minutes à 14000 tours par minute à 4°C. On sèche le culot et le solubilise dans de l'eau milli-Q. On conserve par la suite notre ARN à -20°C.

3.2.10.5 Réaction de « in-line »

Afin de mettre en évidence l'interaction directe entre les aptamères et les différents ligands, plusieurs méthodes expérimentales ont été mises en œuvre, dont la méthode de « in-line probing » (Nahvi et al., 2002). Une méthode souvent utilisée pour éclaircir les structures secondaires et le degré d'affinité à un ligand spécifique. Elle se base essentiellement sur la dégradation naturelle de l'ARN. Lors de l'attaque nucléophile de l'oxygène 2' d'un nucléotide sur le centre phosphoré d'un nucléotide adjacent, lorsque ces deux derniers entrent dans une conformation « en ligne » avec l'oxygène 5' adjacent, l'oxygène assurera le clivage non enzymatique des liaisons phosphodiester du squelette covalent de l'ARN (Regulski & Breaker, 2008).

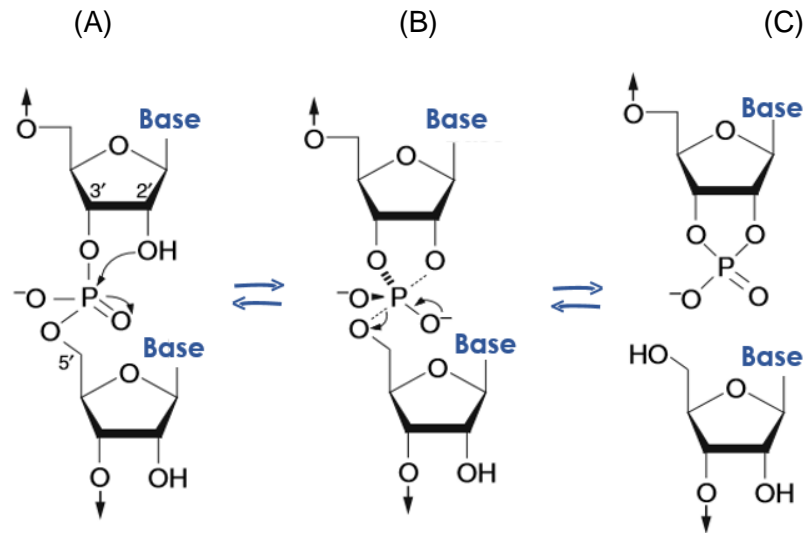


Figure 21 : Explication du mécanisme de la réaction « in-line ». Adapté de (Regulski & Breaker, 2008)

A : Arrangement linéaire de l'oxygène en position 2' d'un nucléotide, du phosphore et de l'oxygène en position 5' du nucléotide adjacent ; **B** : Attaque nucléophile réalisée par l'oxygène en position 2' aboutissant au clivage de la liaison phosphodiester établie entre deux nucléotides (**C**).

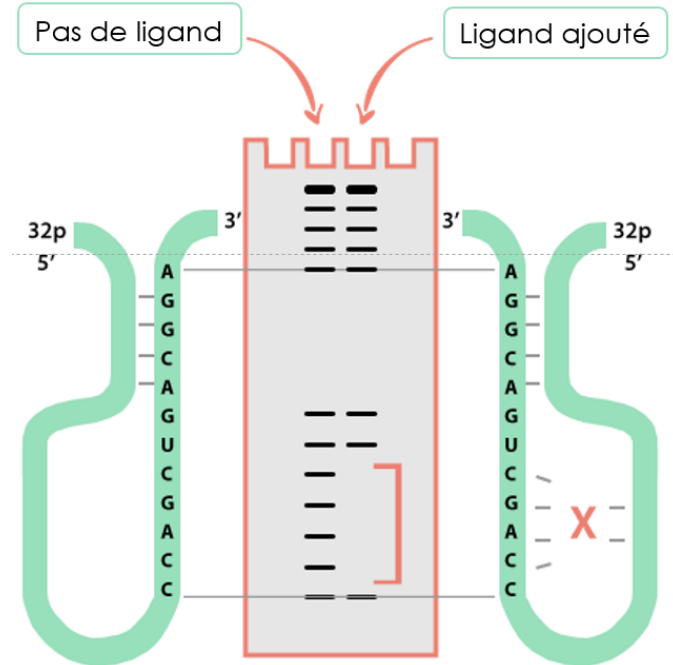


Figure 22 : Schéma d'un gel de dégradation par in-line. Adapté de (Regulski & Breaker, 2008).

Remarquez la différence dans les schémas de clivage (indiqué par un crochets) entre les réactions sans et avec le ligand présent. Des changements se produisent dans la configuration de la structure secondaire de l'ARN lors de la liaison de l'ARN.

Certaines liaisons peuvent être verrouillées dans une position stable si les bases font parties d'une hélice double brin, ce qui les rend moins flexibles et moins susceptibles d'échantillonner une conformation en ligne, réduisant ainsi le clivage. Enfin, le modèle de clivage spontané de l'ARN est comparé entre les ARN incubés en l'absence de ligand (métabolite) et les ARN incubés en présence du ligand. Suite à la liaison du ligand, des changements dans le modèle de clivage sur gel nous indiqueront une modification de la structure de l'ARN. Une analyse plus poussée de ce modèle fournit des informations détaillées sur les caractéristiques de la structure secondaire du motif ARN (Regulski & Breaker, 2008)

Cette réaction permet d'étudier les changements des modèles de clivage ce qui indique la liaison d'un métabolite à l'ARN ou non.

La réaction est effectuée dans un volume de 20 µl contenant 10 µl de solution In-line 2X (200 mM KCl, 100 mM Tris-HCl à pH8.3, 200 mM MgCl₂), 4 µl d'ARN radio marqué, 2 µl d'eau milli-Q, 2

µl de chaque concentration des ligands à tester en les incubant pendant 35 à 40 heures à température ambiante, et à la fin de l'incubation on ajoute 20 µl de tampon de chargement dénaturant (DYE) 2X pour arrêter la réaction. Ensuite, l'ARN marqué incubé en présence de différentes concentrations du ligand est comparé sur gel à un témoin non-dégradé et à deux échelles.

- Préparation du témoin NR et des échelles T1 et OH
- La solution NR (Non réagi)

Elle joue le rôle de témoin négatif, elle sert à contrôler la qualité de l'ARN. La réaction est réalisée en incubant 10 µl d'ARN radioactif avec 8 µl d'eau milli-Q et 18 µl de tampon de chargement dénaturant 2X.

- La solution T1 (réaction enzymatique)

La réaction est réalisée en incubant l'ARN radioactif avec l'enzyme ribonucléase T1 qui dégrade l'ARN en le clivant à la suite des résidus guanosine du côté 3, ce qui nous permet d'obtenir une carte de la structure. La réaction a lieu en incubant 10 µl d'ARN radioactif avec 2 µl de citrate de sodium 0.25 M, 2 µl de formamide servant à dénaturer la structure secondaire des ARN pour rendre toutes les positions accessibles à la RNase T1, et 8 µl d'eau milli-Q à 56°C durant 2 minutes, puis ajouter 1 µl d'enzyme T1 (1/100) et incubé à 56°C durant 5 minutes puis ajouter 20 µl de tampon de chargement dénaturant 2X pour arrêter la réaction.

- La solution OH

C'est une réaction alcaline qui dégrade l'ARN à toutes les positions, sans préférence de séquence. La réaction a lieu en incubant 10 µl d'ARN radioactif avec 2 µl d'une solution de carbonate de sodium 0.5M (Na_2CO_3) et 8 µl d'eau milli-Q à 90°C pendant 1 minute puis ajouter 20 µl de tampon de chargement dénaturant 2X pour arrêter la réaction.

- Les ligands utilisés et leurs concentrations

Pour tester les interactions entre nos aptamères et les ligands, les différentes concentrations utilisées sont présentées dans le **tableau 16**.

Tableau 16: Les ligands testés et leurs concentrations

Les ligands testés	Les concentrations
L-Histidine L-Isoleucine L-Arginine Lysozyme Tétracycline Chloramphénicol ATP Manganèse Nickel Zinc	1 mM
	300 μ M
	100 μ M
	30 μ M
	10 μ M
	3 μ M
	1 μ M
	300 μ M
	100 nM
	30 nM
	10 nM
	3 nM
	1 nM

Nous avons aussi effectué des tests avec des ligands non spécifiques pour chacun des aptamères afin de nous assurer de la spécificité de ces derniers.

- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les produits de réaction in-line ont été séparés grâce à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8% en conditions dénaturantes afin de visualiser le profil de dégradation des ARN. Cette méthode est effectuée de la même manière décrite dans la section 3.2.1 mais pour une concentration de 8% le gel se compose de 56 ml d'acrylamide 20%, 8M urée et de 84 ml d'une

solution de TBE 1X, 8M urée, 1600 µL d'APS 10% et 60 µL de TEMED pour la polymérisation. La migration se fait à 55 W pendant 3 heures environ. Après arrêt de la migration, le gel est séché en utilisant un appareil de séchage « 583 Electrophoresis Gel Dryer Bio-Rad » durant 2 heures à une température de 80°C puis exposé toute la nuit sur une cassette « storage phosphor screen, Molecular Dynamics ». La cassette est scannée par le Typhoon FLA 9500 (GE healthcare Life Sciences) et les résultats obtenus sont utilisés pour le calcul de Kd en utilisant le logiciel « Image Quant ».

3.3 Sélection des aptamères qui présentent un changement de conformation par la méthode SR-PAGE : une nouvelle méthode de sélection

Dans le but de tester la sélection des aptamères qui subissent un changement de conformation lors du contact avec les ligands avec une méthode qui ne nécessite pas l'immobilisation sur un support solide, nous avons optimisé la mise au point de la méthode SR-PAGE. Cette partie du mémoire a été réalisée en collaboration avec ma collègue du laboratoire Kamar Daou.

3.3.1 Principe et méthodologie

Le SR-PAGE (*Shifted Reverse-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) est une méthode basée sur le changement de structure des aptamères en présence de leurs ligands, ce qui induit un changement de vitesse de migration dans un gel de polyacrylamide natif. C'est une méthode développée au sein du laboratoire de Jonathan Perreault.

Le principe de la méthode se résume en 3 grandes étapes :

Dans un premier temps une première migration a lieu pendant 24h à voltage constant de 500 V à une température de 4°C en déposant notre librairie d'oligonucléotides et un marqueur de migration fluorescent dans les puits situés en haut d'un gel de polyacrylamide 10% natif (sans urée), dans le but de conserver la structure secondaire des oligonucléotides lors de la migration, en mélangeant 83 ml d'une solution Acrylamide : Bis- acrylamide 30% (29 :1), 25 ml de tampon TBMg 10X (0,9 M Tris Base, 0,9 M acide borique, 50 mM acétate de magnésium) et 142 ml d'eau. On utilise seulement 150 ml du mélange, auquel on ajoute 70 µL de TEMED et 2 mL d'APS 10%, le reste est gardé à 4°C pour la suite des manipulations. Le tout est lié à un système de pompe péristaltique afin d'assurer une recirculation du tampon TBMg 1X. Souvent, une prémigration a lieu pendant une nuit sous tension sans les échantillons avant d'effectuer la première migration.

La deuxième étape consiste à arrêter la première migration, démonter le montage du gel acrylamide, couper les puits et vaporiser une solution de ligands d'intérêts sur le gel de manière

uniforme et la laisser agir pendant 10 min. Le montage du gel est remis en place, puis nous ajoutons, à la solution du gel restante, le ligand à une concentration 10 fois moindre que celle aspergée et on l'utilise pour combler l'espace vide entre les deux vitres.

La troisième étape consiste à redémarrer une deuxième migration, mais en prenant soin d'inverser les polarités. De cette manière, les ARN rebroussement chemin et migrent dans le sens inverse. Puisque nous gardons le même temps de migration de 24h et le même voltage de 500V, les ARN qui n'interagissent pas avec le ligand ne changent pas de conformation et migrent de la même façon que lors de la première migration jusqu'à revenir au point de départ que l'on appelle la ligne de base. Par contre, les ARN ayant interagi avec le ligand changent de conformation, entraînant un changement de migration dans le gel. Par exemple, si la liaison rend la structure plus compacte, la migration sera plus rapide, arrivant ainsi plus haut que la ligne de base ou inversement si la liaison rend la structure plus lâche, l'ARN migrera plus doucement et se retrouvera en dessous de la ligne de base.

Pour finir, le gel est séché sous vide pendant 1 heure et est exposé sur une plaque phosphore (storage phosphor screen, Molecular Dynamics) pendant une nuit. La lecture se fait par la suite avec le Typhoon FLA 9500 (GE healthcare Life Sciences).

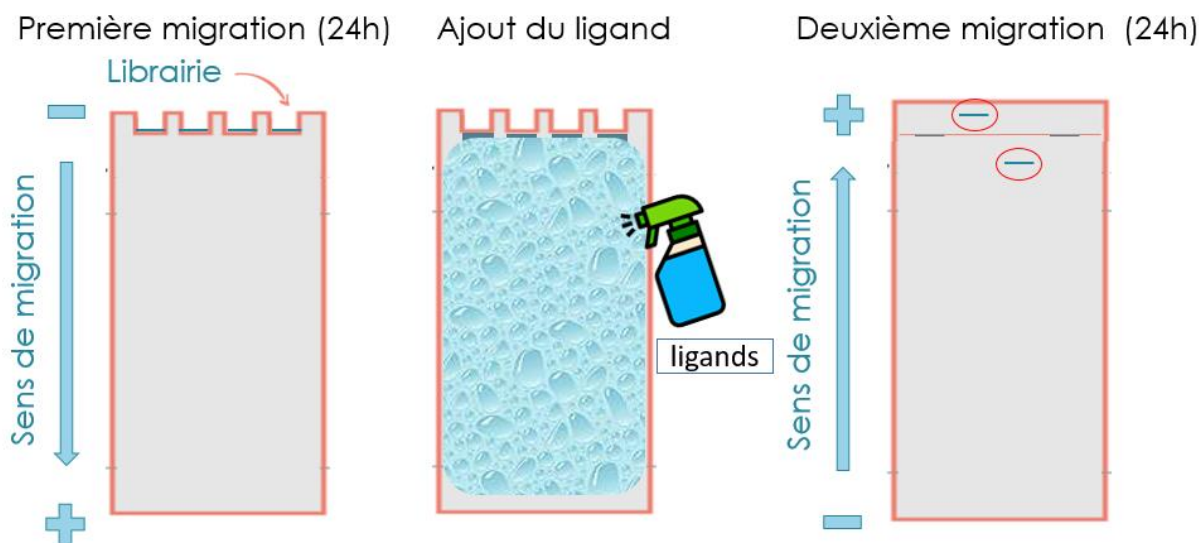


Figure 23: Représentation schématique de SR-PAGE (Shifted Reverse-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

3.3.2 Optimisation de la méthode de SR-PAGE : température, temps de migration, voltage et taille du gel

Avant d'utiliser la méthode de SR-PAGE dans le SELEX pour étudier l'effet de l'interaction entre les oligonucléotides de notre librairie d'ARN et les ligands, nous avons commencé par optimiser la méthode en visant trois paramètres : La taille des vitres utilisées (et par le fait même, la taille du gel), La température utilisée, Le voltage et le temps de migration. Pour faire ces essais nous avons utilisé un ensemble de riboswitches connus comme contrôle positif (**tableau 17**).

Tableau 17: Les riboswitches utilisés pour optimiser la SR-PAGE

Les riboswitch utilisés	Nom	Séquence (5'-3')	Tm
Riboswitch TPP	Séquence JP 024	TAATACGACTCACTATAGGACTCGGGGTGCCCTTCTGCGTGAA GGCTGAGAAATACCCGTATCACC	49 °C
	Séquence JP 025	GTGGTCCGTGAACTTCCCTACGCTGGCATTATCCAGATCAGGT GA TACGGGTATTTCTC	
Riboswitch c-di-GMP	Séquence EA 054	TAATACGACTCACTATAGGGAAAAATGTCACGCACAGGGC	55 °C
	Séquence EA 055	GGTTTAGGCCGGAGGCTTTGCGTCCCCTCTTTTGAATGGT TTGCCCTGTGCGTG	
	Séquence EA 056	CTCCGGCCTAAACCAGAAGACATGGTAGGTAGCGGGGTTA CCGATGGCAAATGCATACA	
	Séquence EA 057	AAAGCATGCATTCATAGTGTCAATGATGAGTCAACAAAGTG TATGCATTTTGCCATCG	
Riboswitch FMN	Séquence EA 036	TAATACGACTCACTATAGGGCTTATTCTCAGGGCGG	53 °C
	Séquence EA 039	GTGGCGGCATATAGCCAA	

Avant de les déposer dans les puits du gel pour la première migration, les échantillons d'ARN marqués sont préparés comme le présente le **tableau 18** :

Tableau 18: Préparation des échantillons utilisés pour l'optimisation de la méthode SR-PAGE

	Volume	Concentration finale
Séquence d'ARN marquée	X	50 cpm
Tampon de chargement natif	3,33 µl	1X
Tampon de migration TBMg 10X	2 µl	1X
Eau stérile	Jusqu'à 20 µl	

Tampon de chargement natif 6X (40% de sucrose, 0,05% bleu de bromophénol et 0,05% bleu de xylène cyanol)

La solution de ligand qu'on a vaporisé uniformément sur toute la surface du gel à la fin de la première migration, ne contient que le ligand Thiamine Pyrophosphate (TPP) à une concentration de 3 µM pour les essais d'optimisation avec l'aptamère TPP.

4 RÉSULTATS

4.1 Conception de la librairie et des amorces pour le SELEX

4.1.1 Conception et visualisation des librairies d'ADN pour le SELEX

Dans cette étude les aptamères utilisés ont été récupérés de la plateforme « Apta-Index » qui contient des centaines d'aptamères différents. Ces aptamères correspondent à environ une centaine de ligands différents incluant des petites molécules, des protéines et même des cellules. Par contre, les essais effectués se concentrent sur quelques ligands seulement.

Nous avons effectué des modifications sur ces aptamères afin de forcer le changement de conformation attendu. Le brin d'ADN matrice est formé de la séquence de notre aptamère de base, de 5 nucléotides complémentaires à chaque fois à une partie de la séquence qui vont assurer le repliement de la séquence d'ARN, le tout est flanqué entre deux parties constantes de 20 nucléotides de long. Ces deux régions sont importantes pour pouvoir amplifier les séquences complètes par PCR, elles sont utilisées comme sites d'hybridation des amorces.

Les 5 nucléotides complémentaires sont différents d'un aptamère à un autre et pour chaque aptamère, plusieurs versions différentes ont été conçues pour que chaque fois ils s'hybrident au niveau d'une partie différente de la séquence, ce qui augmente la probabilité que nous puissions forcer un changement de conformation chez ces aptamères. Donc pour chaque aptamère, nous avons conçu plusieurs designs différents dépendamment de la position à laquelle les 5nt complémentaires s'hybrident.

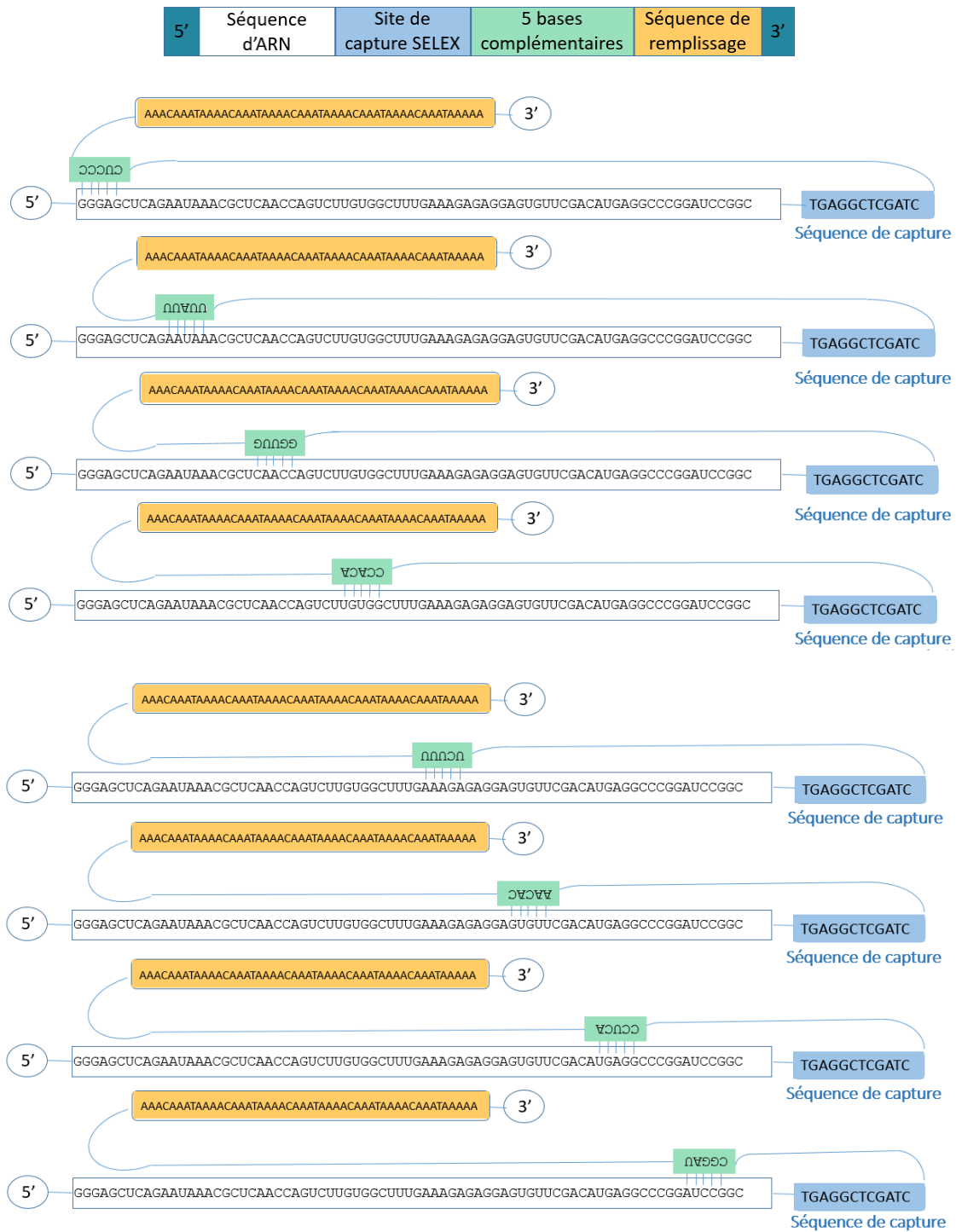


Figure 24: Représentation schématique du changement conformationnel attendu

Pour la librairie normale, une purification sur gel de la bande recherchée a été effectuée due à l'obtention de quelques bandes non spécifiques. Une PCR mutagène a aussi été effectuée afin d'intégrer des erreurs et d'augmenter potentiellement les chances d'obtenir le changement de conformation attendu. Le résultat de l'amplification des deux librairies normale et mutagène a été visualisé sur un gel d'agarose comme présenté dans la **figure 25**.

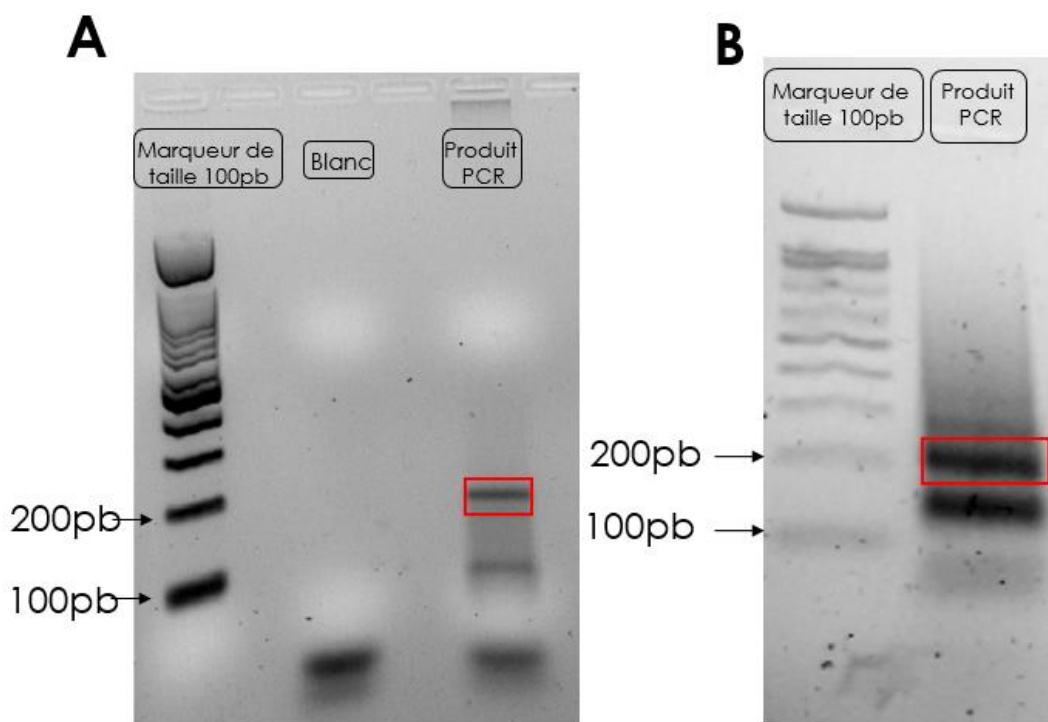


Figure 25: Visualisation du produit de PCR de la librairie normale et mutagène

(A) : librairie normale et (B) mutagène. Image d'un gel d'agarose à 2% visualisé. Le rectangle rouge encadrant la bande correspond à la de taille 190pb comparée au marqueur de taille.

4.2 Sélection des aptamères qui présentent un changement de conformation par la méthode Capture SELEX

4.2.1 Immobilisation de l'oligonucléotide de capture sur les billes magnétiques

La sélection des aptamères a été effectuée en utilisant des billes magnétiques NHS. La première étape consiste à immobiliser les oligonucléotides avec la séquence de capture sur les billes, car ils joueront le rôle d'intermédiaire entre les billes magnétiques et notre librairie d'ARN. Cette étape relève d'une grande importance on a donc utilisé le microscope Zeiss Axio Observer 7 (Caméra Axiocam 512) pour vérifier l'immobilisation de la séquence sur les billes magnétiques. La

particularité de la séquence de capture c'est qu'elle est composée d'une amine du côté 5' qui lui permettra de se fixer sur les billes NHS, et du Cy5 à l'extrémité 3' qui est un marqueur fluorescent qui nous a permis de visualiser la fixation avec le microscope. La présence de fluorescence sur les billes, suite à plusieurs lavages, a confirmé la fixation de l'oligonucléotide de capture fluorescent sur les billes magnétiques NHS (**Figure 26**).

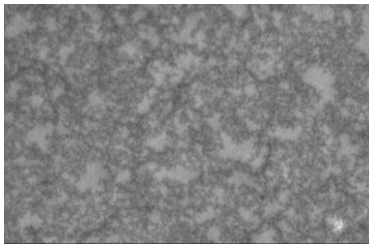
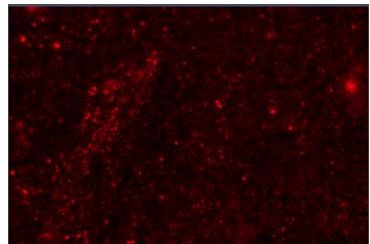
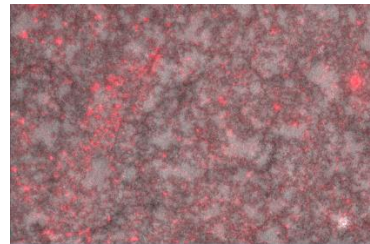
Mode du microscope	En phase (A)	Lecture de fluorescence (B)	En merge (C)
Les billes magnétiques avec l'oligonucléotide de capture			

Figure 26: Résultats des images du microscope pour la vérification de l'étape d'immobilisation de l'oligonucléotide de capture sur les billes magnétiques

(A) Sur le mode « en phase » du microscope, qui présente la lecture sans fluorescence, le résultat est une image en noir et blanc, où les billes représentent les taches en noir et la partie blanche correspond au bruit de fond.

(B) Sur le mode « lecture de fluorescence » du microscope, le résultat est un fond en noir et des points en rouge qui correspondent à la fluorescence de notre oligonucléotide de capture marqué avec le Cy5, ce qui correspond aux billes magnétiques fonctionnalisées avec l'oligonucléotide de capture.

(C) Sur le mode « merge » du microscope, qui permet d'intercaler les deux modes « en phase » et « en fluorescence » afin de s'assurer qu'il s'agit bien des billes fonctionnalisées avec l'oligonucléotide fluorescent et non pas d'une agglomération de fluorescence. Le résultat obtenu confirme que la fluorescence provient effectivement de l'emplacement des billes.

Grâce à cette étape, nous avons donc pu confirmer la fixation de l'oligonucléotide de capture fluorescent sur les billes magnétiques NHS.

4.2.2 Immobilisation de l'ARN sur l'oligonucléotide de capture

Après avoir réussi à immobiliser l'oligonucléotide de capture sur les billes magnétiques grâce à la liaison NHS-NH₂, cet oligonucléotide servira maintenant d'intermédiaire entre la librairie d'ARN et les billes magnétiques. Vu l'importance de cette étape, nous avons effectué une vérification grâce au marquage radioactif de la librairie d'ARN afin de pouvoir déterminer la concentration des billes adéquate à utiliser.

Comme le montre la **figure 27** les concentrations de 1 nM, 3 nM, 10 nM et 30 nM sont très faibles au point qu'on ne voit presque pas de radioactivité, par contre les concentrations des billes de 100 nM, 300 nM et 1 μ M sont suffisantes pour retenir les ARN. Pour se fixer sur la concentration adéquate, on a effectué une quantification de l'intensité de radioactivité de ces taches afin de s'assurer qu'on a atteint un certain palier et de finir par choisir la concentration de billes de 1 μ M comme concentration adéquate. En effet, il est important de ne pas avoir un grand excès de billes, sinon la surabondance d'oligonucléotides complémentaires à la séquence de capture pourrait réduire l'éluion des aptamères qui ont une capacité de « switch » induite par leur ligand.

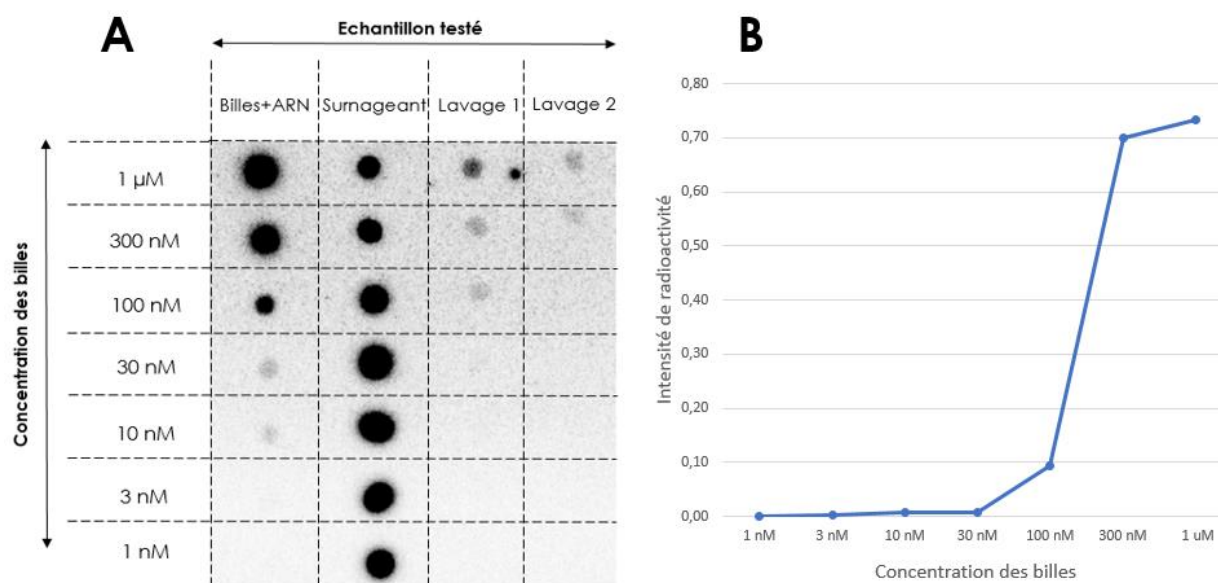


Figure 27: Test de radioactivité avec les différentes concentrations des billes et quantification de l'intensité de la radioactivité observée

A : Radioactivité révélée sur une plaque de phosphore après une exposition de 4h : d'ARN lié aux billes, de surnageant et de deux lavages déposés sur un papier Whatman.

B : les valeurs de la courbe représentent le ratio bille sur le total.

4.2.3 Test d'affinité des générations

Pour évaluer l'enrichissement et l'affinité des générations de SELEX, un test d'affinité a été réalisé. Les résultats obtenus sur le papier whatman pour les tours de SELEX 1 et 2, pour lesquels on a utilisé le mix de tous les ligands, et pour les tours de SELEX 3 et 4, pour lesquels on a utilisé quatre groupes de ligands différents, montrent qu'il y a eu des séquences qui se sont effectivement détachées des billes suite au changement de conformation au contact avec les ligands, comme le montre les figures ci-dessous. L'observation de la radioactivité au niveau de l'ARN élué, pour les générations 1, 2, 3 et 4, confirme que des séquences d'ARN se sont détachées des billes magnétiques suite à la mise en contact avec le ligand.

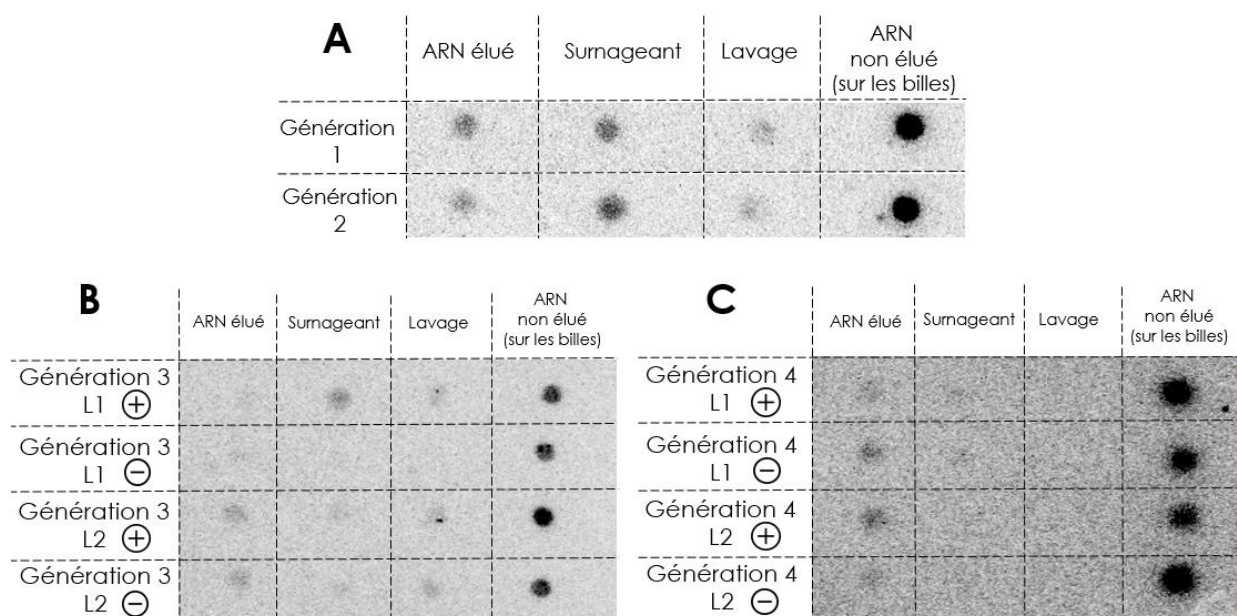


Figure 28: Évolution de l'affinité des bibliothèques

Radioactivité révélée sur une plaque de phosphore après une exposition de 4h : de l'ARN élué, de surnageant, du lavage et d'ARN liés aux billes déposées sur un papier Whatman pour les générations de SELEX 1 et 2. La colonne ARN éluée correspond aux potentiels aptamères qui se sont détachés des billes suite au contact avec les ligands. La colonne des ARN éluée correspond aux séquences qui sont restées fixées sur les billes après le contact avec les ligands. (A) La génération 1 correspond à la bibliothèque suite à la première sélection de SELEX et la génération 2 suite à la 2^e sélection. (B et C) La génération 3 correspond la bibliothèque suite à la 3^e sélection du SELEX et la génération 4 suite à la 4^e. L1 + et L1 - : le premier groupe de ligand (L-isoleucine / L-histidine / L-arginine / tétracycline / lysozyme / chloramphénicol / ATP) avec ou sans glutathion, respectivement. L2+ et L2- : le deuxième groupe de ligand (manganèse / nickel / zinc) avec ou sans glutathion, respectivement.

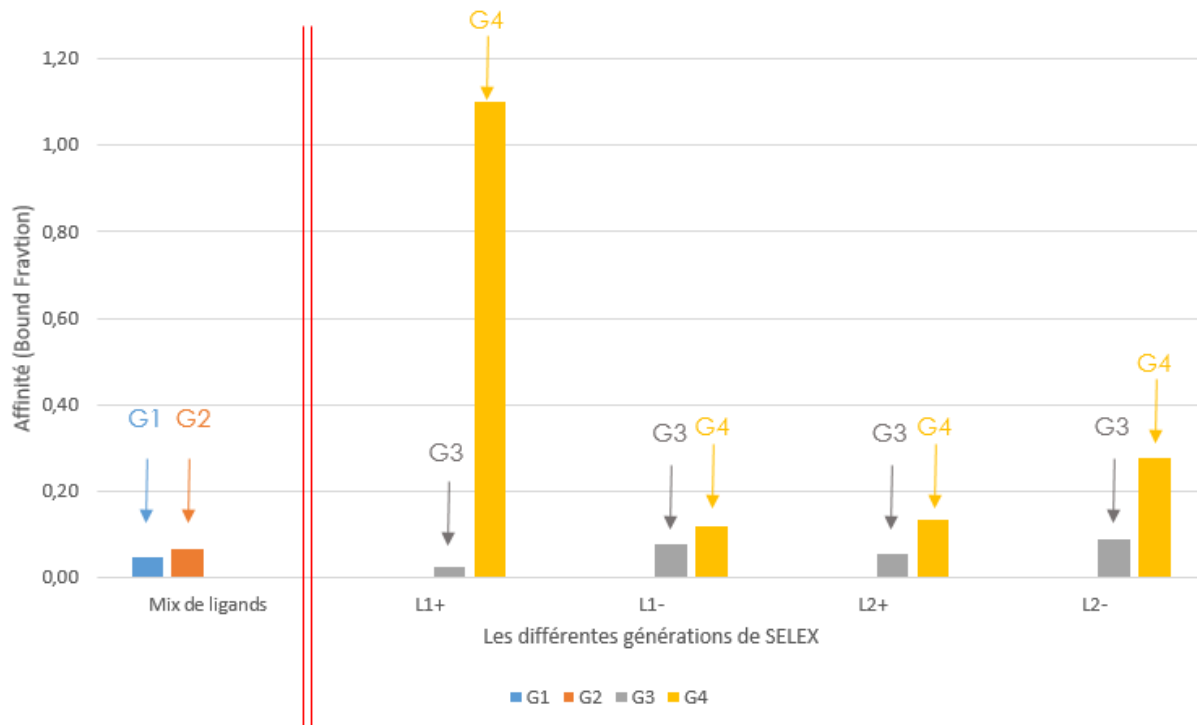


Figure 29: Quantification de l'intensité de la radioactivité observée dans les figures 31 et 32, pour les générations 1, 2, 3 et 4

G1 en bleu correspond à la génération 1 de SELEX et G2 en orange correspond à la génération 2 de SELEX pour lesquels nous avons utilisé un mix de tous les ligands combinés. G3 en gris correspond à la génération 3 de SELEX et G4 en jaune correspond à la génération 4 de SELEX pour lesquels nous avons utilisé les quatre combinaisons de ligands L1+, L1-, L2+ et L2-

Afin d'observer s'il y a enrichissement d'une génération de SELEX à une autre, nous avons utilisé le logiciel *ImageJ*. Le logiciel quantifie l'intensité de la radioactivité de chaque tache correspondant à l'ARN élué par rapport au total des taches et par rapport au blanc pour obtenir l'histogramme ci-dessus.

L'histogramme est divisé en deux parties, une première partie contenant les deux premières générations (en bleu et orange) qui ont été effectuées dans les mêmes conditions soit : les oligonucléotides d'ARN fixés sur les billes ont été mis en contact avec un mix contenant tous les ligands combinés. On déduit une légère évolution de l'enrichissement entre la 1re et la 2e génération en augmentant de 0,04 à 0,06.

Dans la 2e partie de l'histogramme nous observons le résultat des générations 3 et 4 avec leurs différents groupes de ligands, L1+, L1-, L2+ et L2-. Comme attendu en comparant chaque groupe de ligand, d'une génération à une autre on observe un enrichissement visible : pour le groupe de ligand L1+ nous observons une augmentation importante passant de 0,03 à 1,1, pour le groupe de ligand L1- (contenant : L-Isoleucine / L-Histidine / L-Arginine / Tétracycline / Lysozyme /

Chloramphénicol / ATP, sans le glutathion) nous observons une augmentation de 0,07 à 0,11, pour le groupe de ligand L2+ (contenant : Manganèse / Nickel / Zinc avec le glutathion) nous observons une augmentation de 0,06 à 0,12 et pour le groupe de ligand L2- (contenant : Manganèse / Nickel / Zinc sans le glutathion) nous observons une augmentation de 0,08 à 0,3. Ces résultats étaient assez convaincants pour envoyer les différentes générations au séquençage à haut débit pour déterminer les aptamères ayant potentiellement été élués via l'induction par leur ligand respectif.

4.2.4 Séquençage Sanger

En parallèle au séquençage à haut-débit, qui fournit beaucoup de données, mais a des temps d'attente plus longs, le séquençage Sanger des plasmides a été effectué pour une vingtaine de clones, cinq clones issus chacun de la dernière génération, en considérant deux lectures avec les amorces EB088 et EB089.

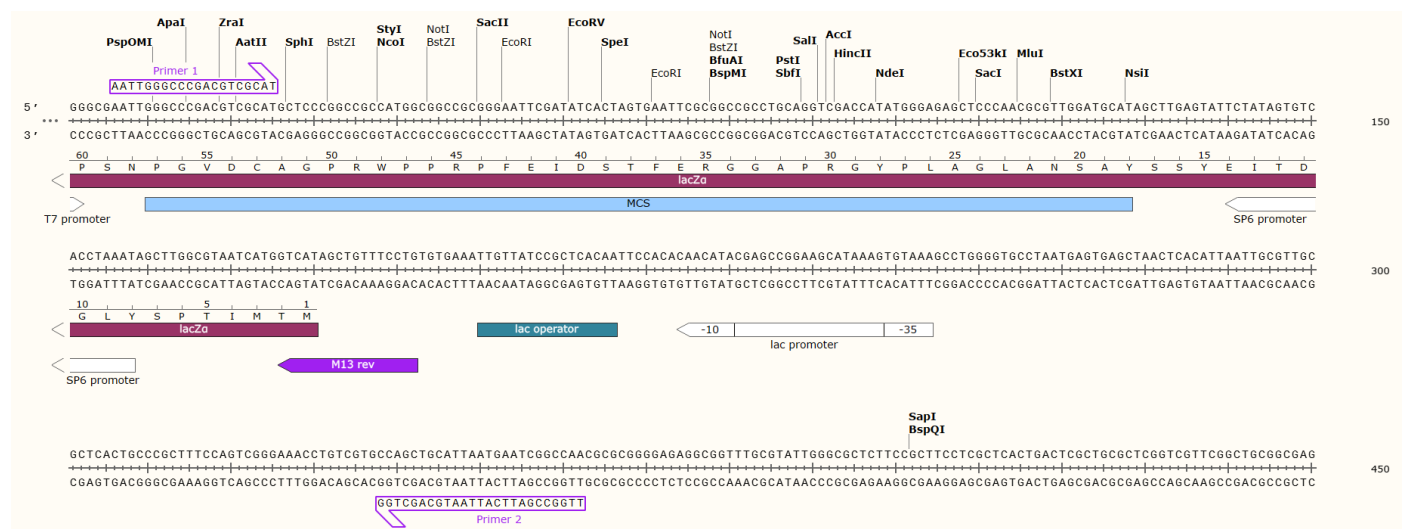


Figure 30: Représentation du plasmide pGEM-T Easy avec SnapGene Viewer

Primer 1 : l'amorce EB088 qui assure la lecture sens. Primer 2 : l'amorce EB089 qui assure la lecture anti-sens.

Un exemple du résultat de séquence est présenté dans la **figure 31**.

```
A : Lecture sens avec l'amorce EB088
>ID|11539509 G4_L2plus_C3_FW_P2119149_003.ab1 de 50 à 556
TATGTCGGATGCATGCAGTGTCTATTCTCGAGTAGCGATCGCTAGGTCGGATGTACGATCGCTAGG
TCGGATGTTAATACGACTCACTATAGGGAAGACATTATGTCCGATGCAGCGATCGCTAGGTCGGAT
GTACGATCGCTAGGTCGGATGTTAATACGACTCACTATAGGGAAGGACATTATGTCCGATGGGGGC
GATCGTAGGTCGGATGTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGC
TCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATG
GTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAG
CATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACT
GCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAAT

B : Lecture anti-sens avec l'amorce EB089
>ID|11539527 G4_L2plus_C3_REV_P2119149_004.ab1 de 41 à 557
GACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTTAATACGACTCACTATAGGG
AAGACATTATGTCCGATGCATGCAGTGTCTATTCTCGAGTAGCGATCGCTAGGTCGGATGTACGAT
CGCTAGGTCGGATGTTAATACGACTCACTATAGGGAAGACATTATGTCCGATGCAGCGATCGCTAG
GTCGGATGTACGATCGCTAGGTCGGATGTTAATACGACTCACTATAGGGAAGGACATTATGTCCGA
TGGGGGCGATCGTAGGTCGGATGTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATG
GGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCG
TAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAG
CCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACAT

Consensus :
TTAATACGACTCACTATAGGGAAGACATTATGTCCGATGCATGCAGTGTCTATTCTCGAGTAGCGA
TCGCTAGGTCGGATGTACGATCGCTAGGTCGGATGTTAATACGACTCACTATAGGGAAGACATTAT
GTCCGATGCAGCGATCGCTAGGTCGGATGTACGATCGCTAGGTCGGATGTTAATACGACTCACTAT
AGGGAAGGACATTATGTCCGATGGGGGCGATCGTAGGTCGGATGTA
```

Figure 31: Résultat de séquençage Sanger pour un clone de la génération 4

A : Séquence issue de la lecture sens avec l'amorce EB088. B : Séquence issue de la lecture anti-sens avec l'amorce EB089. Code de couleurs : Bleu : les régions correspondant au plasmide. Jaune : la séquence correspondante à l'insert.

En analysant les résultats du séquençage nous avons remarqué qu'une séquence était observable dans la majorité des cycles de SELEX, la séquence de l'aptamère Anti-NF- κ B p65 (D1) (Wurster & Maher, 2008) et une autre séquence qui correspond à l'aptamère de FMN (Fan et al., 1996) qu'on a dans notre librairie de base.

4.2.5 Analyse des résultats de séquençage à haut débit

Afin d'aligner les séquences obtenues suite au séquençage à haut débit et de connaître leur abondance dans chacune des générations de SELEX, nous avons utilisé le programme Aptasuite. Pour les différents groupes séquencés de la 4e génération, nous n'avons pas obtenu un nombre suffisant de « Reads », le nombre de « Reads » varie entre 59 et 95.

Pour la librairie d'ADN séquencée, quelques séquences possèdent une taille autour de 70 nucléotides de long qui est inférieure à la taille attendue, mais la majorité correspond à des

fragments très courts entre 2 et 10 nucléotides (**Figure 32**). Les séquences de très petite taille obtenues peuvent être dues à la formation des concatémères avec les amorces utilisées. Nous n'avons donc trouvé aucun motif ou cluster abondant correspondant à notre taille attendue. Ceci suppose un artefact d'amplification pour la préparation au séquençage et/ou pour la préparation des générations de SELEX. Ainsi, avec ces données, il n'est pas possible de savoir si un enrichissement a eu lieu.

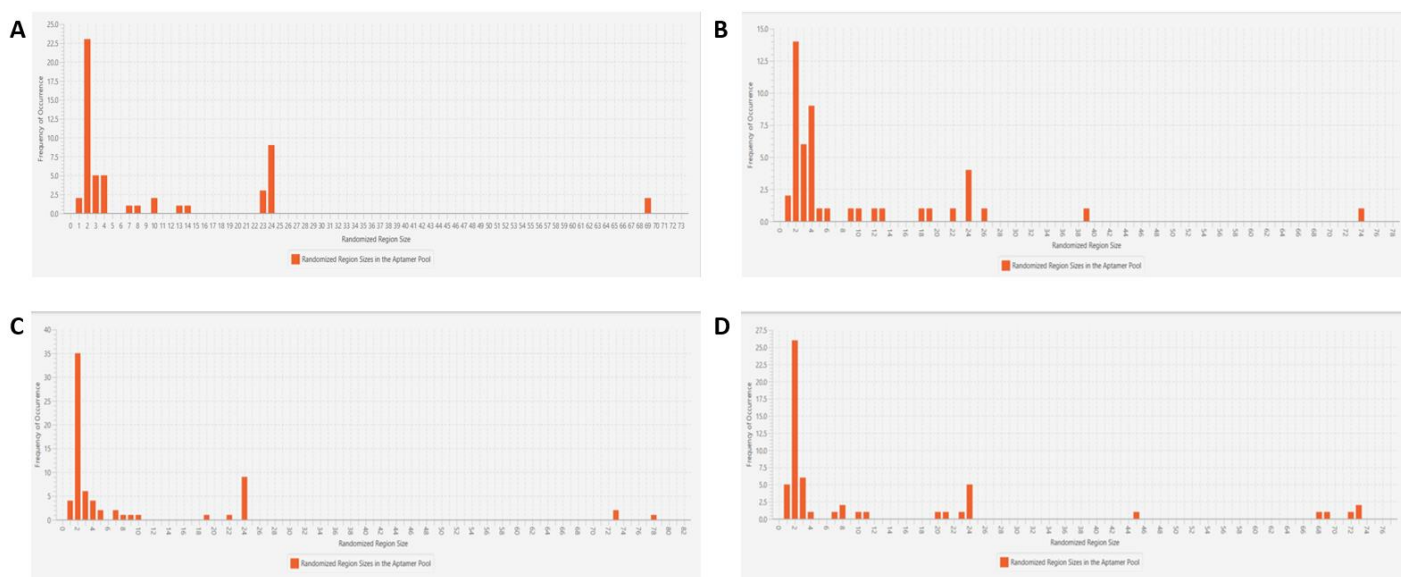


Figure 32: Distribution des tailles de lectures de séquences obtenues à la fin du SELEX.

Capture d'écran de l'interface du logiciel Aptasuite pour la génération 4 avec les différentes combinaisons de ligands, L'interface comporte des informations sur la distribution de la taille des séquences et la composition du cycle.

A et B: librairie d'ADN pour la génération 4 avec la combinaison de ligands L1 sans et avec glutathion respectivement.

B et C: librairie d'ADN pour la génération 4 avec la combinaison de ligands L2 sans et avec glutathion respectivement.

4.2.6 Test de spécificité

Pour évaluer la spécificité et l'affinité des aptamères sélectionnés à leurs ligands, un test de spécificité a été réalisé. Suite aux résultats obtenus par séquençage, nous avons décidé d'évaluer l'aptamère Anti-NF- κ B p65 (D1) pour mieux comprendre la raison de sa sélection. En parallèle, quelques exemples dans la librairie ont aussi été choisis à titre comparatif et pour étudier aussi la possibilité de leur acquisition d'une capacité de changement de conformation.

Comme expliqué dans la partie **3.2.6**, grâce au marquage ^{32}P de nos ARN, on peut estimer l'affinité et la spécificité de chaque ligand à son aptamère correspondant. Nous avons donc effectué un cycle de SELEX pour chacun des aptamères : chloramphénicol, L-arginine, manganèse, zinc, nickel, en utilisant une fois le ligand spécifique à l'aptamère et une fois le mix de ligands utilisés dans nos générations de SELEX précédentes, mais en éliminant le ligand spécifique à l'aptamère en question.

Pour ce qui est de l'aptamère Anti-NF- κ B p65 (D1), nous avons utilisé le clone qu'on a sélectionné dans la partie **3.2.8**, qu'on a mis en contact avec le mix de ligands utilisé dans les SELEX 1 et 2 effectués dans la partie **3.2.4**.

Pour ce test d'interaction (identique à une génération de SELEX telle que déjà décrite), on a utilisé une fois les ligands spécifiques pour les aptamères testés (**figure 33 A**), et une fois le mix de ligands utilisé dans les générations de SELEX 1 et 2 effectués dans la partie **4.2.4**, mais en éliminant à chaque fois le ligand spécifique à l'aptamère en question (**figure 33 B**).

Comme le présente la **figure 33**, les résultats obtenus sur le papier whatman montrent une radioactivité importante au niveau de la colonne ARN éluée pour les aptamères mis en contact avec leur ligand spécifique (**figure 33 A**). C'est le détachement des séquences d'ARN des billes suite au changement de conformation au contact avec le ligand qui explique la radioactivité observée, ce qui supporte aussi la spécificité de chacun des aptamères (chloramphénicol, L-arginine, manganèse, zinc, nickel) à son ligand, et pour l'aptamère Anti-NF- κ B p65 (D1) on observe aussi un détachement des séquences d'ARN des billes suite au contact avec le mix de ligands utilisé dans le SELEX 1 et 2 ne contenant pas le ligand spécifique à l'aptamère Anti-NF- κ B p65 (D1).

Ce détachement est très faible quand l'aptamère est mis en contact avec un mix de ligands ne contenant pas son ligand spécifique (**figure 33 B**) comme pour les aptamères L-arginine et manganèse. Par contre pour l'aptamère du nickel on observe un détachement assez important des séquences d'ARN des billes même si l'aptamère n'a pas été mis en contact avec son ligand spécifique.

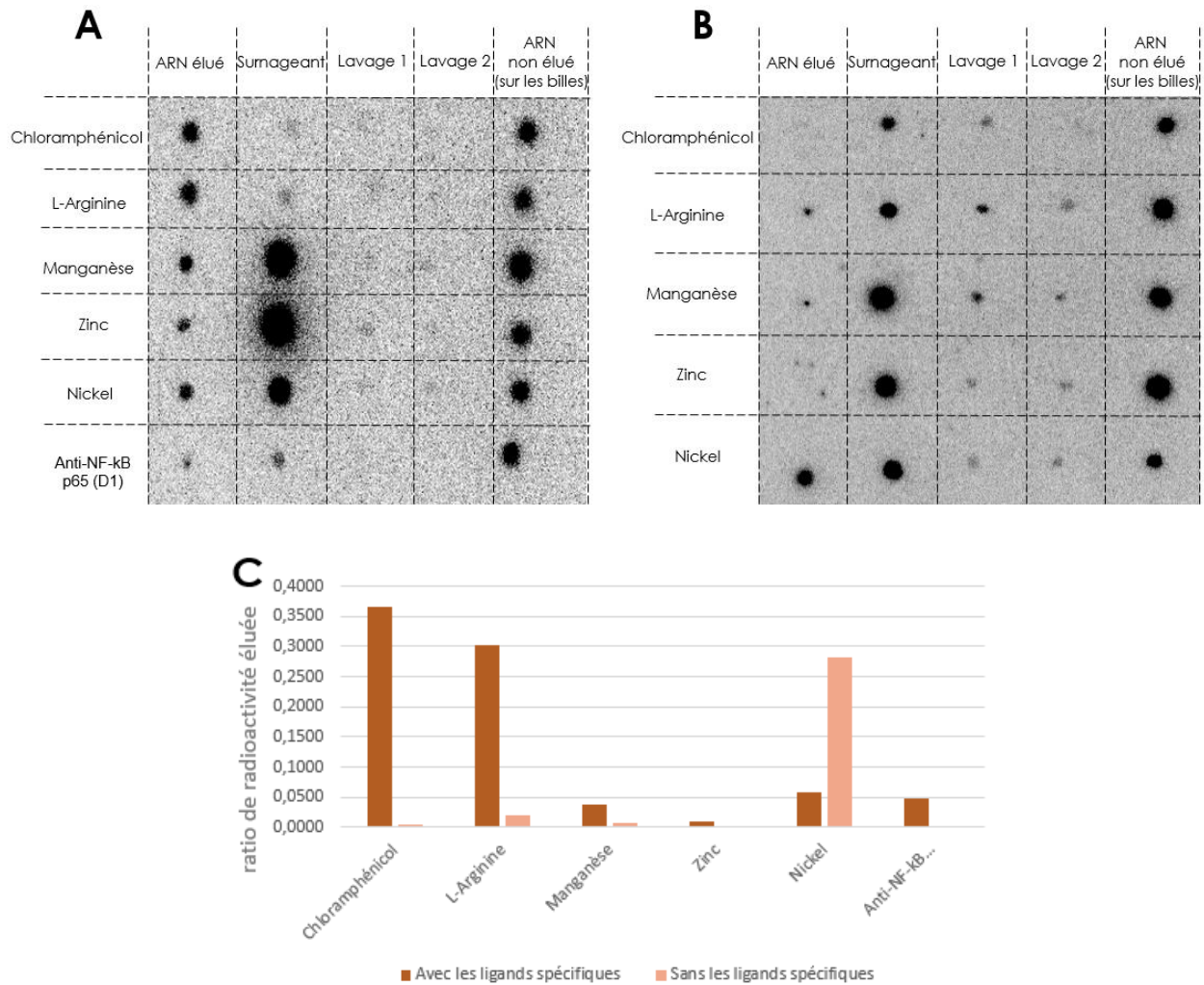


Figure 33: Affinité des aptamères à leurs ligands

A et B : Radioactivité révélée sur une plaque de phosphore après une exposition de 4h : de l'ARN élué, de surnageant, du lavage 1 et 2 et d'ARN liés aux billes déposées sur un papier Whatman pour un tour de SELEX pour les aptamères : Chloramphénicol, L-Arginine, Manganèse, Zinc, Nickel et notre clone correspondant à l'aptamère Anti-NF-kB p65 (D1). La colonne ARN éluée correspond aux potentiels aptamères qui se sont détachés des billes suite au contact avec les ligands. La colonne des ARN non éluée correspond aux séquences qui sont restées fixées sur les billes après le contact avec les ligands. **A :** Chacun des aptamères chloramphénicol, L-arginine, manganèse, zinc, nickel a été mis en contact avec son ligand spécifique pour ce tour de SELEX. L'aptamère Anti-NF-kB p65 (D1) a été mis en contact avec un mix contenant tous les ligands (le mix de ligands utilisé dans les tours de SELEX 1 et 2 effectués dans la partie 4.2.4, ne contenant pas le ligand spécifique à l'aptamère Anti-NF-kB p65 (D1))

B : Chacun des aptamères chloramphénicol, L-arginine, manganèse, zinc, nickel a été mis en contact avec un mix contenant tous les ligands sauf le ligand spécifique à l'aptamère testé à chaque fois.

C : Quantification de l'intensité de la radioactivité pour les différents aptamères testés avec et sans leurs ligands spécifiques : Les barres en brun correspondent aux aptamères qui ont été mis en contact avec leurs ligands spécifiques, les barres en rose correspondent aux aptamères qui ont été mis en contact avec des ligands non spécifiques. C'est la fraction éluée qui mesurée.

La **figure 33 (A)** montre qu'on obtient des taches de radioactivité dans la colonne ARN éluée pour chaque aptamère mis en contact avec son ligand spécifique, ce qui correspond au résultat attendu. Pour l'aptamère Anti-NF-kB p65 (D1), les séquences d'ARN correspondantes sont quand même éluées et détachées des billes même si le mix de ligands utilisé ne contient pas le ligand spécifique de cet aptamère, ce qui suppose que ce détachement des billes est du à d'autres facteurs et non pas au contact avec le ligand.

La **figure 33 (B)** montre que chacun des aptamères testés mis en contact avec des ligands non spécifiques peut effectivement être élué et détaché des billes même avec des proportions très faibles, comme le montre la colonne des ARN élués. On remarque que pour l'aptamère chloramphénicol aucune des séquences n'a été éluée, ce qui nous fait penser à une spécificité assez élevée de cet aptamère à son ligand.

Les aptamères chloramphénicol, L-arginine, manganèse et zinc présentent visiblement une affinité pour leurs ligands spécifiques, avec un ratio de radioactivité éluée qui peut atteindre 0.35 (figure 34 A et C), contrairement à l'aptamère du nickel qui présente une plus haute radioactivité lors du contact avec des ligands non spécifiques que lors du contact avec des ligands spécifiques. Pour l'aptamère Anti-NF-kB p65 (D1), environ 5% de la radioactivité est éluée suite au contact avec des ligands non spécifiques (figure 34 A et C), ce qui confirme que le détachement des séquences de l'aptamère Anti-NF-kB p65 (D1) n'est pas en liaison avec le contact de son ligand spécifique dans ce cas, mais avec d'autres facteurs.

4.2.7 Le « in-line probing » pour la détermination de la constante de dissociation K_d

Afin de voir le potentiel de changement de conformation de base de certains aptamères, nous avons réalisé des dégradations « in-line » de l'ARN qui permet d'évaluer des changements de structure induits via l'observation du patron de dégradation.

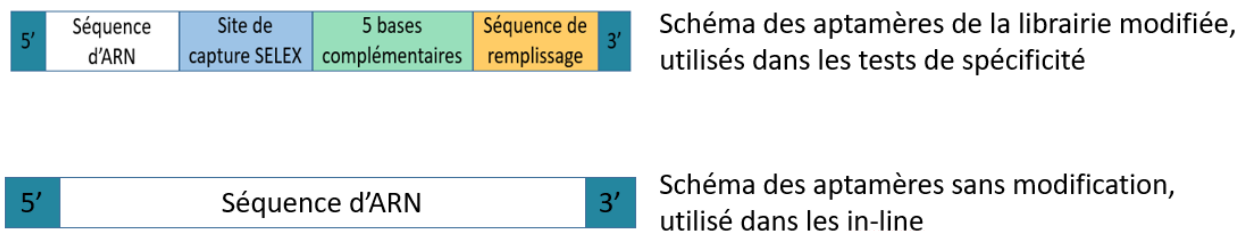


Figure 34: schéma représentant les séquences d'aptamères testés par in-line

Tous les aptamères de notre liste ont été testés à différentes concentrations de leurs ligands spécifiques allant de 1 nM à 1 mM. Les résultats de migration sur gel de polyacrylamide montrent le profil de dégradation des ARN en présence des ligands spécifiques pour trois aptamères de la liste (chloramphénicol, lysozyme, tétracycline) pour lesquels nous avons observé une modulation.

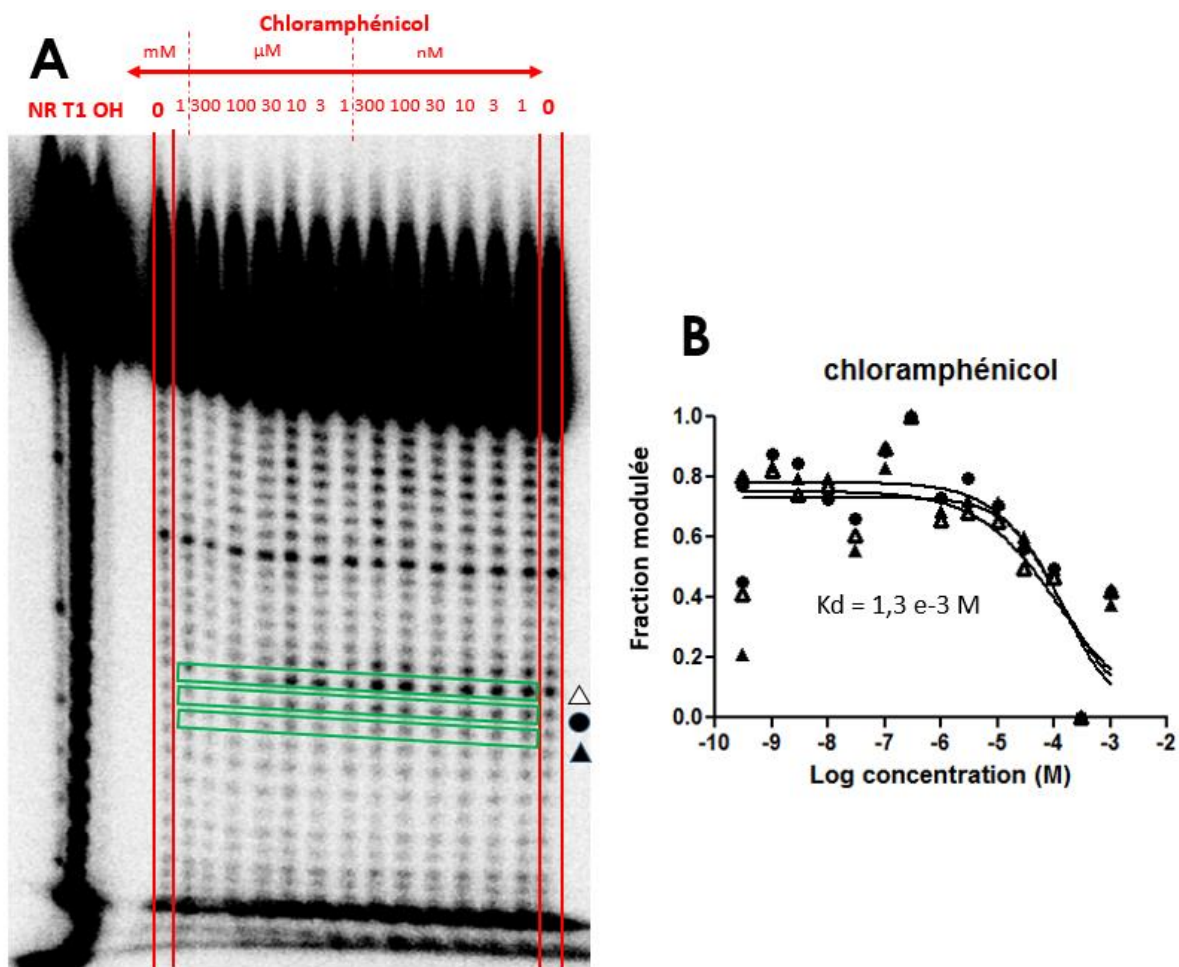


Figure 35: Modulation de la structure de l'aptamère chloramphénicol induite par son ligand

Les chiffres correspondent aux concentrations des ions en mM, μM et nM. NR, T1 et OH représentent respectivement les résultats de dégradation de l'ARN seul, de l'ARN incubé avec l'enzyme T1 et de l'ARN incubé en conditions alcalines. Les rectangles en vert correspondent à la modulation détectée en présence du ligand spécifique. Les concentrations identifiées ici comme 10^{-12} sont en fait des témoins sans chloramphénicol (il n'est pas possible de mettre des valeurs de 0 sur une échelle log).

Chaque forme géométrique réfère à une bande de modulation utilisée pour le calcul du K_d .

A : Profil de dégradation de l'aptamère Chloramphénicol en présence de son ligand spécifique

B : Intensité normalisée des bandes en fonction du log des concentrations en ligand spécifique pour l'aptamère chloramphénicol

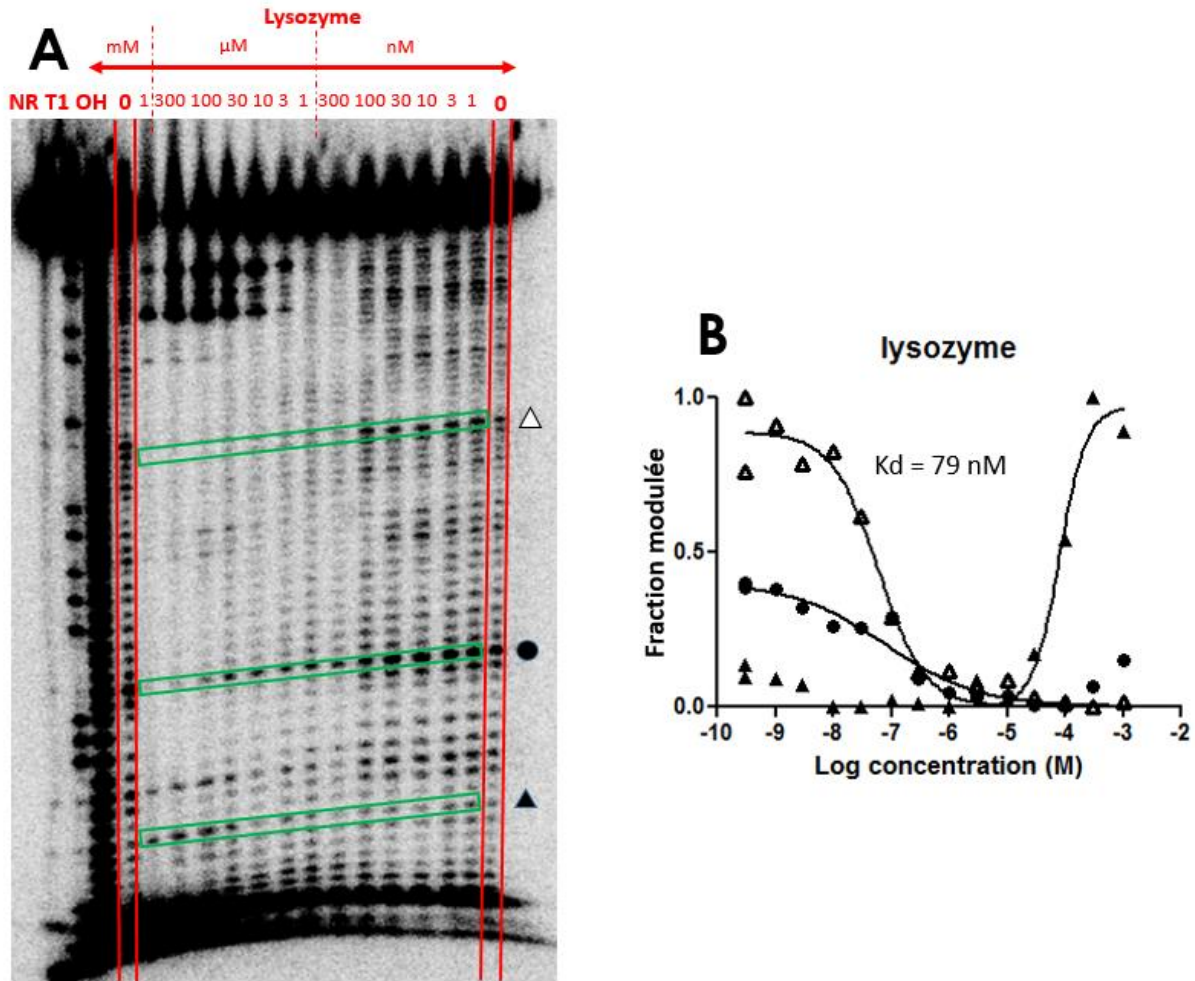


Figure 36: Modulation de la structure de l'aptamère lysozyme induite par son ligand

Les chiffres correspondent aux concentrations des ions en mM, μM et nM. NR, T1 et OH représentent respectivement les résultats de dégradation de l'ARN seul, de l'ARN incubé avec l'enzyme T1 et de l'ARN incubé en conditions alcalines. Les rectangles en vert correspondent à la modulation détectée en présence du ligand spécifique.

Chaque forme géométrique réfère à une bande de modulation utilisée pour le calcul du K_d .

A : Profil de dégradation de l'aptamère lysozyme en présence de son ligand spécifique

B : Intensité des bandes en fonction du log des concentrations en ligand spécifique pour l'aptamère lysozyme

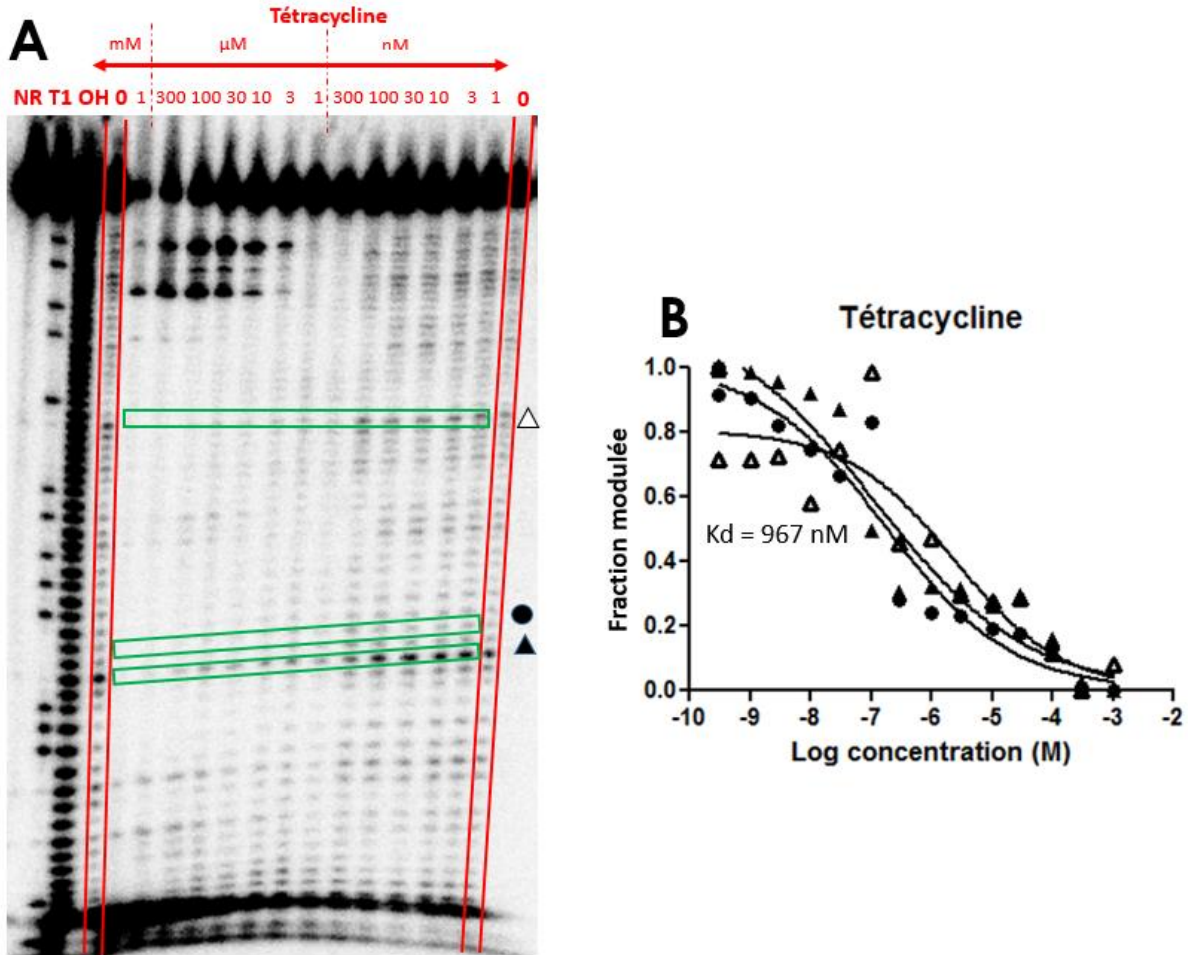


Figure 37: Modulation de la structure de l'aptamère tétracycline induite par son ligand

Les chiffres correspondent aux concentrations des ions en mM, μM et nM. NR, T1 et OH représentent respectivement les résultats de dégradation de l'ARN seul, de l'ARN incubé avec l'enzyme T1 et de l'ARN incubé en conditions alcalines. Les rectangles en vert correspondent à la modulation détectée en présence du ligand spécifique.

Chaque forme géométrique réfère à une bande de modulation utilisée pour le calcul du K_d .

A : Profil de dégradation de l'aptamère tétracycline en présence de son ligand spécifique

B : Intensité des bandes en fonction du log des concentrations en ligand spécifique pour l'aptamère tétracycline

Comme présenté dans **les figures 35, 36 et 37** une modulation du profil de dégradation des ARN de chloramphénicol, lysozyme et tétracycline est observée en présence de leurs ligands spécifiques. En effet, l'intensité de certaines bandes change avec l'augmentation de la concentration des ligands Chloramphénicol, Tétracycline et Lysozyme, ce qui est résumé par les

courbes de ces mêmes figures (**figures 35(B), 36(B) et 37(B)**), mais en même temps est aussi révélatrice de la faible modulation obtenue, et donc d'une assez grande incertitude quant aux valeurs exactes des Kd calculées. Le **tableau 19** présente le calcul de Kd pour les bandes qui subissent une modulation de leur intensité en comparaison avec les valeurs de Kd de la littérature, et nous montre que le Kd obtenu par in-line pour l'aptamère chloramphénicol est beaucoup plus élevées que les valeurs publiées. Les valeurs de Kd pour la tétracycline et lysozyme sont quant à elles très proches.

Tableau 19: les résultats du Kd obtenu par in-line probing en comparaison avec les valeurs de la littérature

(Apta-Index™ (Aptamer Database) - Library of 500+ Aptamers, s. d.)

	Kd de chaque bande à partir de l'in-line Probing	Kd à partir de l'in-line Probing (±) écart-type	Kd à partir d'Apta-Index
Chloramphénicol	1.3 mM	1.3 mM (±) 0.13 mM	110 nM
	1.2 mM		
	1.5 mM		
Lysozyme	98 nM	79 nM (±) 26 nM	31 nM
	60 nM		
	7900 nM (non pris en compte)		
Tétracycline	728 nM	967 nM (±) 261 nM	1000 nM
	1247 nM		
	926 nM		

Afin de nous assurer de la spécificité des aptamères testés, nous avons aussi testé ces aptamères avec des ligands non spécifiques à une concentration de 100 fois leur Kd, comme présenté dans la **figure 38**. Pour les aptamères testés dans les réactions in-line avec des ligands

non spécifiques (**figure 38**) aucune modulation du profil de dégradation n'a été observée pour l'aptamère lysozyme (**figure 38 (A)**) dont le schéma de dégradation est similaire entre les différents ligands non spécifiques. À l'opposé, le profil de dégradation de l'aptamère chloramphénicol (**figure 38 (B)**) change considérablement d'un puit à l'autre, en particulier pour les ligands manganèse, zinc et nickel, ce qui pourrait être dû à une interaction non-spécifique due au fait que ces ligands sont des ions métalliques chargés positivement et donc en mesure d'interagir avec les charges négatives des phosphates. Le profil de dégradation de l'aptamère tétracycline (**figure 38 (C)**) n'a quant à lui presque pas de dégradation visible avec les ligands testés sauf avec le ligand lysozyme.

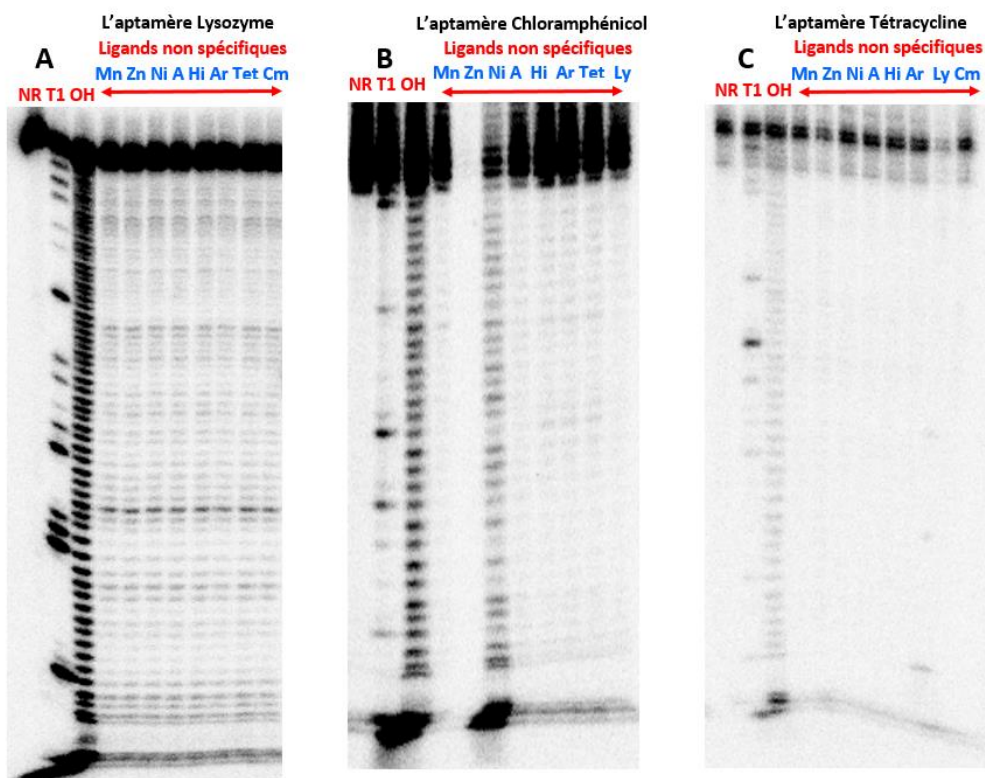


Figure 38: Visualisation du profil de dégradation de chacun des aptamères lysozyme, chloramphénicol et tétracycline en présence des ligands non spécifiques

A : l'aptamère lysozyme testé avec les ligands suivants dans l'ordre: manganèse- zinc- nickel- ATP- L-histidine- L-arginine-tétracycline- chloramphénicol

B : l'aptamère chloramphénicol testé avec les ligands suivants dans l'ordre: manganèse- zinc- nickel- ATP- L-histidine- L-arginine-tétracycline- lysozyme

C : l'aptamère Tétracycline testé avec les ligands suivants dans l'ordre: manganèse- zinc- nickel- ATP - L-histidine- L-arginine - lysozyme – chloramphénicol

4.3 Sélection des aptamères qui présentent un changement de conformation par la méthode SR-PAGE : une nouvelle méthode de sélection

L'optimisation de la méthode de SR-PAGE s'est portée sur trois paramètres :

- La taille des vitres utilisées (et par le fait même, la taille du gel)

Nous avons effectué des essais avec différentes tailles de vitres dans le but de rendre la manipulation plus facile et d'économiser la quantité de produits pour la préparation du gel de polyacrylamide (certains ligands peuvent être très coûteux). Les vitres de grandes tailles avaient des dimensions de 44 cm / 38 cm, les dimensions des vitres moyennes étaient de 40 cm / 34 cm, les dimensions des petites vitres étaient de 24 cm / 16 cm.

- La température utilisée

L'expérience est généralement réalisée à une température de 4°C, nous avons donc effectué des essais de la méthode à température ambiante dans le but de faciliter et simplifier les conditions du SR-PAGE.

- Le voltage et le temps de migration

Le voltage choisi est en relation très étroite avec le temps de migration, dont plusieurs compositions voltage/temps de migration ont été testées. Nous avons effectué des essais de voltage de 500 V, 450 V, 300 V et 250 V. Nous avons effectué des essais de temps de migration de 24 heures, 12 heures, 7 heures et 3 heures.

L'optimisation de la méthode SR-PAGE est une étape importante pour faciliter son intégration dans le processus de sélection. Pour réaliser l'optimisation, nous avons utilisé des *riboswitches* connus, qui ont été testés au sein du laboratoire, comme contrôles. Il s'agit d'aptamères naturels, qui sous l'effet de leur ligand (un métabolite) modifient le repliement d'une plateforme d'expression pour moduler l'expression du gène en aval. Ces *riboswitches* interagissent avec la Flavine Mononucléotide (FMN), la di-Guanosine MonoPhosphate cyclique (c-di-GMP) et la Thiamine Pyrophosphate (TPP). Nous avons effectué plusieurs gels de migration avec le FMN et le c-di-GMP comme témoins négatifs et le TPP comme témoin positif puisqu'on vaporisait le ligand du TPP sur le gel.

Nous savons déjà que l'interaction ligand-riboswitch pour le TPP rend la structure du complexe plus compacte ce qui accélère la migration et par conséquent cause un dépassement de la ligne de base vers le haut à la fin de la deuxième migration.

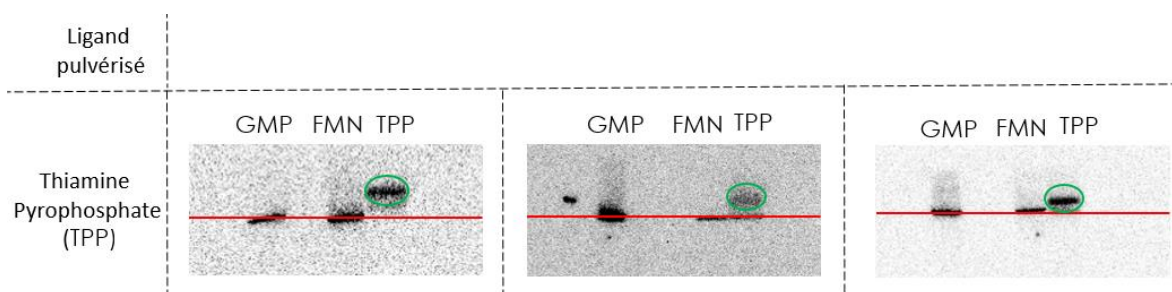


Figure 39: Scan des gels de SR-PAGE

Ces gels ont été répétés afin de valider le fonctionnement de la méthode de SR-PAGE dans les conditions optimisées : petites vitres de 24 cm/16 cm, à une température de 4°C et une migration de 3h dans chaque sens à 500 V. Pour chacun de ces trois gels un seul ligand a été pulvérisé qui est le TPP afin d'interagir avec son riboswitch d'intérêt en réalisant un décalage encerclé en vert de la ligne de base en rouge et servir comme témoin positif, les autres *riboswitches* servent comme témoins négatifs puisqu'ils n'interagissent pas avec le ligand pulvérisé (TPP) et reviennent donc à la ligne de base.

Comme constaté dans la **figure 39**, seul le riboswitch TPP interagit avec le ligand vaporisé. Cette interaction ligand-riboswitch rend la structure plus compacte, on observe donc, à la fin de la 2e migration, un décalage suite au dépassement de la ligne de base suite à l'accélération de la migration et les autres riboswitchs ont été utilisés comme contrôles positifs, en absence de leurs ligands spécifiques aucune ne change de structure et reviennent à la ligne de base. La répétabilité de ces gels et l'obtention des mêmes résultats nous a permis de valider l'optimisation effectuée pour la méthode de SR-PAGE. Les conditions retenues suite à l'optimisation sont donc les petites vitres de 24 cm/16 cm, une migration de 3h dans chaque sens à 500 V, à une température de 4°C.

La figure 40 présente un exemple de gel de SR-PAGE qui a été effectué dans des conditions non optimales, à la température ambiante au lieu de la température de 4°C. Les résultats obtenus ne sont pas lisibles est ceci peut être expliqué par la diffusion des échantillon du a la température ambiante.

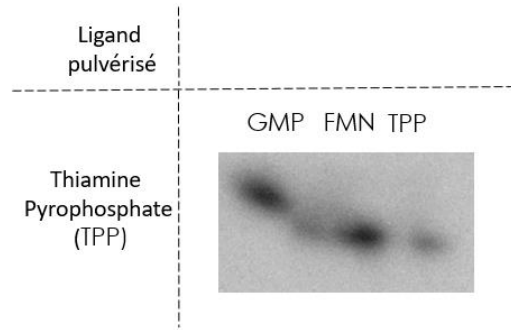


Figure 40: Scan d'un gel de SR-PAGE non réussi

5 DISCUSSION

5.1 Sélection des aptamères qui présentent un changement de conformation par la méthode Capture SELEX

Dans cette partie, nous visons à sélectionner des aptamères qui présentent un « switch » lors du contact avec le ligand. Plusieurs recherches précédentes ont pu sélectionner des aptamères à commutation de structure (He et al., 2021) et plusieurs d'entre eux ont pu développer des biocapteurs grâce à ce genre d'aptamère (Coonahan et al., 2021). Toutefois, nous avons tenté une approche différente en effectuant des modifications sur une grande liste d'aptamères connus et précédemment sélectionnés par d'autres groupes de recherche dans l'espoir de forcer un changement de structure. En effet, ce changement de conformation chez les aptamères fait en sorte qu'ils peuvent être mieux utilisés comme biocapteurs en utilisant le changement de conformation pour produire un signal.

En principe, notre approche de modification des aptamères devrait nous permettre de favoriser la commutation (switch) par l'ajout de cinq nucléotides complémentaires, avec plusieurs versions pour chaque aptamère de façon à sonder presque toute la séquence pour augmenter nos chances qu'une de ces régions complémentaires favorise un changement de structure efficace. À noter que d'autres modifications ont été effectuées, comme l'ajout de la séquence de capture afin de fixer nos séquences sur les billes magnétiques pour la méthode de Capture SELEX. Même si l'utilisation de la méthode de Capture SELEX pour les ARN a été une réussite pour plusieurs recherches (Lauridsen et al., 2018), dans notre cas on peut suspecter que l'ajout de la séquence de capture empêche d'une certaine manière le changement de conformation attendu. Dans une telle situation, les doutes peuvent se pointer en premier lieu sur la méthode de sélection choisie, en deuxième lieu sur le nombre de cycles de sélection réalisé, puisque dans notre cas nous avons effectué quatre cycles de sélection avec différents groupes de ligands pour chaque cycle. Même si certaines recherches ont réussi à réaliser le SELEX en une seule génération et à sélectionner des aptamères au bout d'une seule interaction avec la cible (Kupakuwana et al., 2011), le nombre de cycles reste toujours relatif. En effet, beaucoup de paramètres peuvent affecter l'expérience comme la méthode de sélection, les conditions de SELEX et la molécule cible. D'ailleurs, aucun motif ou cluster abondant à la taille attendue n'a été identifié par l'analyse bioinformatique, bien que le test d'enrichissement effectué par radioactivité nous suggère une évolution positive de l'affinité pour les générations successives, les résultats bioinformatiques pour les dernières générations analysées par Aptasuite ne nous permettent pas de conclure si nous avons un

enrichissement ou non, Notre séquençage Sanger nous indique que certaines constructions sont ressorties du lot. Ce qui suggère plutôt un problème au niveau du séquençage et/ou de la préparation des échantillons.

Et en troisième lieu, les doutes peuvent se pointer sur l'interaction des ligands entre eux tels que les charges négatives du TPP et les cations métalliques (zinc, nickel, manganèse) dans un même mix et/ou de la spécificité de chacun des aptamères modifiés de notre librairie envers son ligand spécifique, puisqu'en faisant le test de spécificité, en mettant en contact les aptamères avec leurs ligands spécifiques une élution importante des séquences d'ARN a lieu, cependant, en les mettant en contact avec un mix de ligand ne contenant pas leur ligand spécifique, l'élution qui a lieu est très faible, mais existante, sauf pour l'aptamère chloramphénicol qui ne présente pas d'ARN élué en contact avec des ligands non spécifiques, ce qui suggère sa spécificité pour son ligand. D'autre part, en mettant notre librairie en contact avec le mix de ligands nous obtenons une tache de radioactivité qui traduit le détachement de quelques séquences des billes magnétiques.

Un clonage suivi d'un séquençage Sanger nous a permis d'identifier les séquences détachées par changement de conformation, aucune ne correspond aux ligands utilisés pour la sélection et la plupart correspondent à l'aptamère Anti-NF-kB p65 (D1), pourtant le mix de ligands utilisé ne contient pas son ligand spécifique. Ceci peut être expliqué par le fait que cette construction de l'aptamère Anti-NF-kB p65 (D1) a réussi à avoir un attachement assez fort aux billes pour éviter un lavage complet, mais que cet attachement n'était pas assez fort pour demeurer totalement lors des étapes de lavages et d'élution, nous arrivons donc à récupérer à chaque lavage un pourcentage qui sera encore significatif une fois arrivé à l'étape de l'élution. Ceci peut aussi être expliqué par la possibilité de présence de groupements chimiques dans le mix de ligands utilisé qui ont peut-être avantagé le détachement de l'aptamère Anti-NF-kB p65 (D1) de la séquence de capture. Cela paraît d'autant plus plausible pour des ligands chargés positivement car l'aptamère Anti-NF-kB p65 (D1) avait déjà été remarqué comme ayant moins de sélectivité que d'autres aptamères sélectionnés par Wurster et collègues, en plus du fait que la cible de l'aptamère était selon toute vraisemblance le site (chargé positivement) de liaison à l'ADN de NF-kB (Wurster & Maher, 2008).

De ce fait, il est suggéré d'effectuer des cycles de sélections avec un ligand à la fois et de comparer le comportement avec le mix de ligands et le ligand spécifique à l'aptamère sélectionné, mais aussi de changer les facteurs de la sélection comme le temps d'incubation ou le rapport (ARN : ligand). Le calcul des K_d effectué grâce à l'in-line *probing* et en comparaison avec les

valeurs de K_D dans la littérature présente un décalage important pour les aptamères chloramphénicol et lysozyme, qui a été confirmé par les graphes obtenus. Ceci suggère peut-être que la structure de l'ARN est rigide ne permettant pas une modulation mesurable de la structure.

De ce fait, et en comparaison avec un SELEX classique qui part d'une librairie aléatoire, le SELEX que nous avons effectué, partant d'une librairie d'aptamères connus avec des modifications visant à forcer la commutation au contact avec le ligand, relève beaucoup de défis par rapport au comportement des séquences face aux ligands suite aux changements effectués, mais également l'effet de ces changements sur la capacité de fixation et détachement des billes magnétiques durant le SELEX de capture. Même si plusieurs travaux de recherche ont réussi à sélectionner des aptamères en utilisant la méthode de SELEX de capture (Shah, 2020; Stoltenburg et al., 2012) dans notre cas, les différents facteurs choisis font de notre SELEX une expérience particulière. En effet, dans nos travaux effectués, malgré le peu de succès de capture-SELEX relié aux problèmes d'amplification, de séquençage ou autre, en choisissant quelques exemples au hasard de notre liste de séquences d'aptamères modifiés dans le but de forcer un changement de conformation, on semble obtenir un assez bon taux de succès qui pourrait être plus exploré dans la continuité du projet. De ce fait, l'usage potentiel de la librairie mutagène dans le SELEX peut représenter un essai intéressant visant à forcer la commutation de structure, ces essais de mutagenèse ont été faits afin d'insérer des mutations, que ce soit sous forme de substitution, d'insertion ou de suppression de base dans la librairie de départ. Ces mutations pourraient jouer un rôle dans le changement de structure de la séquence et par la suite probablement aider à forcer le changement de conformation des aptamères utilisés en effectuant des « ajustements » sur les séquences qui présentent un potentiel de base intéressant. Cette librairie mutagène peut présenter un essai potentiel en perspective à ce travail afin d'étudier son effet sur le changement conformationnel recherché.

5.2 Sélection des aptamères qui présentent un changement de conformation par la méthode SR-PAGE : une nouvelle méthode de sélection

Initialement, la méthode de SR-PAGE devait être utilisée comme méthode de sélection d'aptamères qui présentent un changement de conformation avec la librairie décrite dans ce mémoire. Cependant, avant d'y arriver, l'optimisation de la méthode était souhaitable. Nous avons donc effectué l'optimisation de la méthode en changeant plusieurs conditions de l'expérience et en effectuant des tests avec des riboswitch connus comme témoins. Nous avons obtenu un décalage vers le haut pour la deuxième migration pour le riboswitch TPP en le testant avec son ligand spécifique ce qui confirme un changement de conformation qui rend la structure du

riboswitch plus compacte en présence de son ligand. En effet la méthode de SR-PAGE nécessite des conditions bien déterminées, une température de 4°C pour garder les structures secondaires, un voltage constant et un temps de migration long qui présente une limitation puisqu'un seul cycle de sélection peut durer une semaine avec 24h de migration dans chaque sens, de plus, la méthode requérait la manipulation de grands gels (44 cm x 38 cm) qui représente un défi au moment de retirer la vitre du dessus . Nous avons donc optimisé la technique en validant son fonctionnement dans de nouvelles conditions qui facilitent l'utilisation de la méthode SR-PAGE avec un gel de taille plus petite et un temps de migration nettement plus court qui ne nécessite que 3h de migration à 500V dans chaque sens.

Nous pouvons maintenant confirmer la faisabilité de la méthode de SR-PAGE avec les nouvelles conditions comme une partie intégrante dans le processus de SELEX comme une étape de sélection. Cette méthode présente beaucoup d'avantages en tant que méthode de sélection puisque nous avons la possibilité d'éviter l'étape d'immobilisation sur un support solide et donc la sélection est faite sur la molécule cible elle-même sans modification.

6 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ce projet nous avons visé à réaliser deux objectifs principaux :

- Sélectionner des aptamères qui changent de conformation au contact de leur ligand avec la méthode de SELEX de capture
- Optimiser la méthode de SR-PAGE pour favoriser son utilisation dans le cadre d'un SELEX.

Pour la première partie, nous avons pu effectuer le SELEX de capture sur la librairie d'ARN qu'on a modifiée. La validation de l'enrichissement semblait supportée par un test d'affinité par marquage radioactif. Par contre, l'analyse bioinformatique du séquençage à haut débit des générations de SELEX grâce au programme Aptasuite n'a pas permis de trouver des motifs abondants de la taille attendue. De plus, les séquençages Sanger ne nous ont pas permis d'identifier des aptamères concordant avec les ligands utilisés, mais plutôt l'aptamère Anti-NF-kB p65 (D1) qui, malgré l'absence de son ligand spécifique dans le mix de ligands utilisés, a été sélectionné suite au SELEX de capture. Nous envisagerons donc de vérifier le profil d'interaction avec les différents ligands en effectuant des essais de liaisons et en comparant avec le ligand spécifique de l'aptamère Anti-NF-kB p65 (D1), en effet, une sélection négative pourrait être aussi une solution potentielle pour éliminer toute séquence d'aptamère présentant une spécificité aux billes, de même qu'aux différents groupement existants dans le mix de ligands. Des essais de SELEX avec la librairie mutagène présenterait un essai potentiel en perspective a ce travail afin d'étudier son effet sur le changement conformationnel recherché. Concernant la partie des essais de « inline probing », comme perspective, il serait très intéressant d'effectuer des essais avec les versions « switch » des aptamères testés dans la partie SELEX de capture, cet essai serait utile afin de confirmer que les aptamères modifiés agissent effectivement comme de « switches ». Ces essais pourrait démontrer que la méthode utilisée nous permet en effet d'obtenir des aptamère qui changent de conformation et présenter potentiellement un taux de réussite intéressant qui ne nécessiterait pas forcément un criblage haut débit comme initialement prévu.

Pour la deuxième partie, nous avons réussi à valider les nouvelles conditions d'optimisation de la méthode de SR-PAGE en utilisant des riboswitchs connus comme contrôles positifs. Cette optimisation nous permettra, comme perspective, d'intégrer la technique du SR-PAGE dans le processus de SELEX afin de sélectionner des aptamères qui changent de conformation suite au contact avec le ligand.

7 BIBLIOGRAPHIE

- Adrián, J., Fernandez, F., Muriano, A., Obregon, R., Ramón-Azcón, J., Tort, N., & Marco, M.-P. (2009). Biosensors for Pharmaceuticals and Emerging Contaminants Based on Novel Micro and Nanotechnology Approaches. In *Handbook of Environmental Chemistry, Volume 5: Water Pollution* (Vol. 5, p. 47-68). https://doi.org/10.1007/978-3-540-36253-1_3
- Ahmad, K. M., Oh, S. S., Kim, S., McClellan, F. M., Xiao, Y., & Soh, H. T. (2011). Probing the Limits of Aptamer Affinity with a Microfluidic SELEX Platform. *PLOS ONE*, 6(11), e27051. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027051>
- Alocilja, E. C., & Radke, S. M. (2003). Market analysis of biosensors for food safety. *Biosensors & Bioelectronics*, 18(5-6), 841-846. [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(03\)00009-5](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(03)00009-5)
- Amine, A., Mohammadi, H., Bourais, I., & Palleschi, G. (2006). Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors & Bioelectronics*, 21(8), 1405-1423. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.07.012>
- Apta-Index™ (Aptamer Database)—Library of 500+ Aptamers*. (s. d.). APTAGEN, LLC. Consulté 19 mars 2022, à l'adresse <https://www.aptagen.com/apta-index/>
- Aravind, A., Jeyamohan, P., Nair, R., Veerananarayanan, S., Nagaoka, Y., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Kumar, D. S. (2012). AS1411 aptamer tagged PLGA-lecithin-PEG nanoparticles for tumor cell targeting and drug delivery. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(11), 2920-2931. <https://doi.org/10.1002/bit.24558>

- Badie Bostan, H., Danesh, N. M., Karimi, G., Ramezani, M., Mousavi Shaegh, S. A., Youssefi, K., Charbgoon, F., Abnous, K., & Taghdisi, S. M. (2017). Ultrasensitive detection of ochratoxin A using aptasensors. *Biosensors & Bioelectronics*, *98*, 168-179. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.06.055>
- Bae, H., Ren, S., Kang, J., Kim, M., Jiang, Y., Jin, M. M., Min, I. M., & Kim, S. (2013). Sol-gel SELEX circumventing chemical conjugation of low molecular weight metabolites discovers aptamers selective to xanthine. *Nucleic Acid Therapeutics*, *23*(6), 443-449. <https://doi.org/10.1089/nat.2013.0437>
- Banerjee, J., & Nilsen-Hamilton, M. (2013). Aptamers : Multifunctional molecules for biomedical research. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *91*(12), 1333-1342. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1085-2>
- Battig, M. R., Soontornworajit, B., & Wang, Y. (2012). Programmable Release of Multiple Protein Drugs from Aptamer-Functionalized Hydrogels via Nucleic Acid Hybridization. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(30), 12410-12413. <https://doi.org/10.1021/ja305238a>
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, *60*(1), 1-8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- Bock, L. C., Griffin, L. C., Latham, J. A., Vermaas, E. H., & Toole, J. J. (1992). Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, *355*(6360), 564-566. <https://doi.org/10.1038/355564a0>
- Borghei, Y.-S., Hosseini, M., Dadmehr, M., Hosseinkhani, S., Ganjali, M. R., & Sheikhnejad, R. (2016). Visual detection of cancer cells by colorimetric aptasensor based on aggregation of gold nanoparticles induced by DNA hybridization. *Analytica Chimica Acta*, *904*, 92-97. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.026>

- Burke, D. H., Hoffman, D. C., Brown, A., Hansen, M., Pardi, A., & Gold, L. (1997). RNA aptamers to the peptidyl transferase inhibitor chloramphenicol. *Chemistry & Biology*, 4(11), 833-843. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(97\)90116-2](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(97)90116-2)
- Byun, J. (2021). Recent Progress and Opportunities for Nucleic Acid Aptamers. *Life*, 11(3), 193. <https://doi.org/10.3390/life11030193>
- Cekan, P., Jonsson, E. O., & Sigurdsson, S. T. (2009). Folding of the cocaine aptamer studied by EPR and fluorescence spectroscopies using the bifunctional spectroscopic probe Ç. *Nucleic Acids Research*, 37(12), 3990-3995. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp277>
- Celebanska, A., Chiniforooshan, Y., Janik, M., Mikulic, P., Sellamuthu, B., Walsh, R., Perreault, J., & Bock, W. J. (2019). Label-free cocaine aptasensor based on a long-period fiber grating. *Optics Letters*, 44(10), 2482-2485. <https://doi.org/10.1364/OL.44.002482>
- Chaloin, L., Lehmann, M. J., Sczakiel, G., & Restle, T. (2002). Endogenous expression of a high-affinity pseudoknot RNA aptamer suppresses replication of HIV-1. *Nucleic Acids Research*, 30(18), 4001-4008.
- Chang, Y. M., Donovan, M. J., & Tan, W. (2013). Using aptamers for cancer biomarker discovery. *Journal of Nucleic Acids*, 2013, 817350. <https://doi.org/10.1155/2013/817350>
- Cho, M., Xiao, Y., Nie, J., Stewart, R., Csordas, A. T., Oh, S. S., Thomson, J. A., & Soh, H. T. (2010). Quantitative selection of DNA aptamers through microfluidic selection and high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15373-15378. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009331107>
- Civit, L., Theodorou, I., Frey, F., Weber, H., Lingnau, A., Gröber, C., Blank, M., Dambrune, C., Stunden, J., Beyer, M., Schultze, J., Latz, E., Ducongé, F., Kubbutat, M. H. G., & Mayer, G. (2019). Targeting hormone refractory prostate cancer by in vivo selected DNA libraries

- in an orthotopic xenograft mouse model. *Scientific Reports*, 9, 4976. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41460-2>
- Clark, L. C., & Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102, 29-45. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>
- Coonahan, E. S., Yang, K.-A., Pecic, S., De Vos, M., Wellems, T. E., Fay, M. P., Andersen, J. F., Tarning, J., & Long, C. A. (2021). Structure-switching aptamer sensors for the specific detection of piperazine and mefloquine. *Science Translational Medicine*, 13(585), eabe1535. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abe1535>
- Cox, J. C., & Ellington, A. D. (2001). Automated selection of anti-protein aptamers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9(10), 2525-2531. [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(01\)00028-1](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(01)00028-1)
- Davie, E. W., & Kulman, J. D. (2006). An overview of the structure and function of thrombin. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 32 Suppl 1, 3-15. <https://doi.org/10.1055/s-2006-939550>
- Deng, B., Lin, Y., Wang, C., Li, F., Wang, Z., Zhang, H., Li, X.-F., & Le, X. C. (2014). Aptamer binding assays for proteins : The thrombin example—A review. *Analytica Chimica Acta*, 837, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.055>
- Durand, G., Lisi, S., Ravelet, C., Dausse, E., Peyrin, E., & Toulmé, J.-J. (2014). Riboswitches based on kissing complexes for the detection of small ligands. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 53(27), 6942-6945. <https://doi.org/10.1002/anie.201400402>
- Eaton, B. E., Gold, L., & Zichi, D. A. (1995). Let's get specific : The relationship between specificity and affinity. *Chemistry & Biology*, 2(10), 633-638. [https://doi.org/10.1016/1074-5521\(95\)90023-3](https://doi.org/10.1016/1074-5521(95)90023-3)

- Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, *346*(6287), 818-822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>
- Fan, L., Zhao, G., Shi, H., Liu, M., & Li, Z. (2013). A highly selective electrochemical impedance spectroscopy-based aptasensor for sensitive detection of acetamiprid. *Biosensors & Bioelectronics*, *43*, 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.11.033>
- Fan, P., Suri, A. K., Fiala, R., Live, D., & Patel, D. J. (1996). Molecular Recognition in the FMN – RNA Aptamer Complex. *Journal of Molecular Biology*, *258*(3), 480-500. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0263>
- Fang, X., & Tan, W. (2010). Aptamers generated from cell-SELEX for molecular medicine : A chemical biology approach. *Accounts of Chemical Research*, *43*(1), 48-57. <https://doi.org/10.1021/ar900101s>
- Farjami, E., Campos, R., Nielsen, J. S., Gothelf, K. V., Kjems, J., & Ferapontova, E. E. (2013). RNA Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Selective and Label-Free Analysis of Dopamine. *Analytical Chemistry*, *85*(1), 121-128. <https://doi.org/10.1021/ac302134s>
- Feng, K., Sun, C., Jiang, J., & Yu, R. (2011). An Aptamer-Based Competitive Fluorescence Quenching Assay for IgE. *Analytical Letters*, *44*(7), 1301-1309. <https://doi.org/10.1080/00032719.2010.511747>
- Franchini, M., & Mannucci, P. M. (2012). Thrombin and cancer : From molecular basis to therapeutic implications. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, *38*(1), 95-101. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1300955>
- Galvez, T., & Pin, J. (2003). *Comment fonctionne un récepteur couplé aux protéines G? Le cas des récepteurs métabotropiques du glutamate et du GABA.* <https://doi.org/10.7202/006625AR>

- Gao, S., Zheng, X., Hu, B., Sun, M., Wu, J., Jiao, B., & Wang, L. (2017). Enzyme-linked, aptamer-based, competitive biolayer interferometry biosensor for palytoxin. *Biosensors & Bioelectronics*, 89(Pt 2), 952-958. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.085>
- Geiger, A., Burgstaller, P., von der Eltz, H., Roeder, A., & Famulok, M. (1996). RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Research*, 24(6), 1029-1036. <https://doi.org/10.1093/nar/24.6.1029>
- Gerstein, M., & Krebs, W. (1998). A database of macromolecular motions. *Nucleic Acids Research*, 26(18), 4280-4290. <https://doi.org/10.1093/nar/26.18.4280>
- Giannetti, A., & Tombelli, S. (2021). Aptamer optical switches: From biosensing to intracellular sensing. *Sensors and Actuators Reports*, 3, 100030. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2021.100030>
- Goers, L., Ainsworth, C., Goey, C. H., Kontoravdi, C., Freemont, P. S., & Polizzi, K. M. (2017). Whole-cell *Escherichia coli* lactate biosensor for monitoring mammalian cell cultures during biopharmaceutical production. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(6), 1290-1300. <https://doi.org/10.1002/bit.26254>
- Gopinath, S. C. B. (2007). Methods developed for SELEX. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(1), 171-182. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0826-2>
- Goux, E., Lisi, S., Ravelet, C., Durand, G., Fiore, E., Dausse, E., Toulmé, J.-J., & Peyrin, E. (2015). An improved design of the kissing complex-based aptasensor for the detection of adenosine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(21), 6515-6524. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8818-8>

- Gui, R., Jin, H., Guo, H., & Wang, Z. (2018). Recent advances and future prospects in molecularly imprinted polymers-based electrochemical biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, *100*, 56-70. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.058>
- Guilbault, G. G., & Montalvo, J. G. (1969). A urea-specific enzyme electrode. *Journal of the American Chemical Society*, *91*(8), 2164-2165. <https://doi.org/10.1021/ja01036a083>
- Guilbault, G. G., & Montalvo, J. G. (1970). Enzyme electrode for the substrate urea. *Journal of the American Chemical Society*, *92*(8), 2533-2538. <https://doi.org/10.1021/ja00711a052>
- Hayat, A., & Marty, J. L. (2014). Aptamer based electrochemical sensors for emerging environmental pollutants. *Frontiers in Chemistry*, *2*, 41. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00041>
- He, J., Wang, J., Zhang, M., & Shi, G. (2021). Selection of a Structure-Switching Aptamer for the Specific Methotrexate Detection. *ACS Sensors*. <https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00749>
- Hermann, T., & Patel, D. J. (2000). Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science*, *287*(5454), 820-825. <https://doi.org/10.1126/science.287.5454.820>
- Hoinka, J., Backofen, R., & Przytycka, T. M. (2018). AptaSUITE : A Full-Featured Bioinformatics Framework for the Comprehensive Analysis of Aptamers from HT-SELEX Experiments. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, *11*, 515-517. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.04.006>
- Homola, J., Yee, S. S., & Gauglitz, G. (1999). Surface plasmon resonance sensors : Review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *54*(1), 3-15. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(98\)00321-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(98)00321-9)

- Huntington, J. A. (2005). Molecular recognition mechanisms of thrombin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 3(8), 1861-1872. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01363.x>
- Iliuk, A. B., Hu, L., & Tao, W. A. (2011). Aptamer in bioanalytical applications. *Analytical Chemistry*, 83(12), 4440-4452. <https://doi.org/10.1021/ac201057w>
- Ireson, C. R., & Kelland, L. R. (2006). Discovery and development of anticancer aptamers. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(12), 2957-2962. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0172>
- Irvine, D., Tuerk, C., & Gold, L. (1991). Selexion : Systematic evolution of ligands by exponential enrichment with integrated optimization by non-linear analysis. *Journal of Molecular Biology*, 222(3), 739-761. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90509-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90509-5)
- Jayasena, S. D. (1999). Aptamers : An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical Chemistry*, 45(9), 1628-1650.
- Jenison, R. D., Gill, S. C., Pardi, A., & Polisky, B. (1994). High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5152), 1425-1429. <https://doi.org/10.1126/science.7510417>
- Jiang, B., Li, F., Yang, C., Xie, J., Xiang, Y., & Yuan, R. (2015). Aptamer Pseudoknot-Functionalized Electronic Sensor for Reagentless and Single-Step Detection of Immunoglobulin E in Human Serum. *Analytical Chemistry*, 87(5), 3094-3098. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00041>
- Joeng, C. B., Niazi, J. H., Lee, S. J., & Gu, M. B. (2009). SsDNA aptamers that recognize diclofenac and 2-anilinophenylacetic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(15), 5380-5387. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.06.044>

- Joshi, R., Janagama, H., Dwivedi, H. P., Senthil Kumar, T. M. A., Jaykus, L.-A., Scheifers, J., & Sreevatsan, S. (2009). Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of *Salmonella enterica* serovars. *Molecular and Cellular Probes*, 23(1), 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2008.10.006>
- Keefe, A. D., & Cload, S. T. (2008). SELEX with modified nucleotides. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(4), 448-456. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.06.028>
- Khati, M., Schüman, M., Ibrahim, J., Sattentau, Q., Gordon, S., & James, W. (2003). Neutralization of infectivity of diverse R5 clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 by gp120-binding 2'-F-RNA aptamers. *Journal of Virology*, 77(23), 12692-12698. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.23.12692-12698.2003>
- Khoshfetrat, S. M., & Mehrgardi, M. A. (2017). Amplified detection of leukemia cancer cells using an aptamer-conjugated gold-coated magnetic nanoparticles on a nitrogen-doped graphene modified electrode. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 114, 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2016.12.001>
- Kim, Y. S., Niazi, J. H., & Gu, M. B. (2009). Specific detection of oxytetracycline using DNA aptamer-immobilized interdigitated array electrode chip. *Analytica Chimica Acta*, 634(2), 250-254. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.12.025>
- Kuang, H., Chen, W., Xu, D., Xu, L., Zhu, Y., Liu, L., Chu, H., Peng, C., Xu, C., & Zhu, S. (2010). Fabricated aptamer-based electrochemical « signal-off » sensor of ochratoxin A. *Biosensors & Bioelectronics*, 26(2), 710-716. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.06.058>
- Kupakuwana, G. V., Li, J. E. C., McPike, M. P., & Borer, P. N. (2011). Acyclic Identification of Aptamers for Human alpha-Thrombin Using Over-Represented Libraries and Deep Sequencing. *PLOS ONE*, 6(5), e19395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019395>

- Lauhon, C. T., & Szostak, J. W. (1995). RNA aptamers that bind flavin and nicotinamide redox cofactors. *Journal of the American Chemical Society*, 117(4), 1246-1257. <https://doi.org/10.1021/ja00109a008>
- Lauridsen, L. H., Doessing, H. B., Long, K. S., & Nielsen, A. T. (2018). A Capture-SELEX Strategy for Multiplexed Selection of RNA Aptamers Against Small Molecules. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1671, 291-306. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7295-1_18
- Li, T., Shi, L., Wang, E., & Dong, S. (2009). Multifunctional G-quadruplex aptamers and their application to protein detection. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 15(4), 1036-1042. <https://doi.org/10.1002/chem.200801282>
- Li, X., Zhao, Q., & Qiu, L. (2013). Smart ligand: Aptamer-mediated targeted delivery of chemotherapeutic drugs and siRNA for cancer therapy. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 171(2), 152-162. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.06.006>
- Liu, J., & Lu, Y. (2006). Fast Colorimetric Sensing of Adenosine and Cocaine Based on a General Sensor Design Involving Aptamers and Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(1), 90-94. <https://doi.org/10.1002/anie.200502589>
- Liu, W., Zhu, X., Mozneb, M., Nagahara, L., Hu, T. Y., & Li, C.-Z. (2021). Lighting up ATP in cells and tissues using a simple aptamer-based fluorescent probe. *Mikrochimica Acta*, 188(10), 352. <https://doi.org/10.1007/s00604-021-05012-8>
- Lou, X., Qian, J., Xiao, Y., Viel, L., Gerdon, A. E., Lagally, E. T., Atzberger, P., Tarasow, T. M., Heeger, A. J., & Soh, H. T. (2009). Micromagnetic selection of aptamers in microfluidic channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 2989-2994. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813135106>

- Lu, C., Tang, Z., Liu, C., Kang, L., & Sun, F. (2015). Magnetic-nanobead-based competitive enzyme-linked aptamer assay for the analysis of oxytetracycline in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(14), 4155-4163. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8632-3>
- Luzi, E., Minunni, M., Tombelli, S., & Mascini, M. (2003). New trends in affinity sensing. *Trends in Analytical Chemistry - TrAC*, 22, 810-818. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01208-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01208-1)
- Macaya, R. F., Schultze, P., Smith, F. W., Roe, J. A., & Feigon, J. (1993). Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8), 3745-3749. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3745>
- Maguis, S. (2008). *Biocapteurs à fibres optiques fondés sur les réseaux de Bragg en angle fonctionnalisés*.
- Mairal, T., Ozalp, V. C., Lozano Sánchez, P., Mir, M., Katakis, I., & O'Sullivan, C. K. (2008). Aptamers: Molecular tools for analytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(4), 989-1007. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1346-4>
- Mehmet, L. Y., & Necip, A. (2017). A Review : Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors for Determination of Biomolecules/Drug. *Current Analytical Chemistry*, 13(1), 13-17.
- Mendonça, S. D., & Bowser, M. T. (2004). In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *Journal of the American Chemical Society*, 126(1), 20-21. <https://doi.org/10.1021/ja037832s>
- Meure, L. A., Foster, N. R., & Dehghani, F. (2008). Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: A review. *AAPS PharmSciTech*, 9(3), 798-809. <https://doi.org/10.1208/s12249-008-9097-x>

Misono, T. S., & Kumar, P. K. R. (2005). Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry*, 342(2), 312-317. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.04.013>

Molecular Cloning Technical Guide. (s. d.). 40.

Monosik, R., Stredansky, M., Tkac, J., & Šturdík. (2012). Application of Enzyme Biosensors in Analysis of Food and Beverages. *Food Analytical Methods*, 5, 40. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9222-4>

Mosing, R. K., & Bowser, M. T. (2009). Isolating aptamers using capillary electrophoresis-SELEX (CE-SELEX). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 535, 33-43. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-557-2_3

Mosing, R. K., Mendonsa, S. D., & Bowser, M. T. (2005). Capillary electrophoresis-SELEX selection of aptamers with affinity for HIV-1 reverse transcriptase. *Analytical Chemistry*, 77(19), 6107-6112. <https://doi.org/10.1021/ac050836q>

Myszka, D. G., Jonsen, M. D., & Graves, B. J. (1998). Equilibrium analysis of high affinity interactions using BIACORE. *Analytical Biochemistry*, 265(2), 326-330. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2937>

Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M. S., Zou, X., Brown, K. L., & Breaker, R. R. (2002). Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chemistry & Biology*, 9(9), 1043.

Niazi, J. H., Lee, S. J., & Gu, M. B. (2008). Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(15), 7245-7253. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.06.033>

Nimjee, S. M., White, R. R., Becker, R. C., & Sullenger, B. A. (2017). Aptamers as Therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 57, 61-79. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558>

Nucleic Acid Aptamers for Diagnostics and Therapeutics : Global Markets : BIO071C | BCC Research. (s. d.). Consulté 13 octobre 2021, à l'adresse <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/nucleic-acid-aptamers-market.html>

Nur, Y., Gaffar, S., Hartati, Y., & Subroto, T. (2021). Applications of electrochemical biosensor of aptamers-based (APTASENSOR) for detection of leukemia biomarker. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 32, 100416. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2021.100416>

Orava, E. W., Cicmil, N., & Gariépy, J. (2010). Delivering cargoes into cancer cells using DNA aptamers targeting internalized surface portals. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1798(12), 2190-2200. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.02.004>

Patel, D. J., Suri, A. K., Jiang, F., Jiang, L., Fan, P., Kumar, R. A., & Nonin, S. (1997). Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. *Journal of Molecular Biology*, 272(5), 645-664. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1281>

Perumal, V., & Hashim, U. (2014). Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of Applied Biomedicine*, 12(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2013.02.001>

Pristoupil, T. I., & Kramlová, M. (1968). Microchromatographic separation of ribonucleic acids from proteins on nitrocellulose membranes. *Journal of Chromatography*, 32(4), 769-770. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)80565-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)80565-3)

Prudent, J. R., Uno, T., & Schultz, P. G. (1994). Expanding the Scope of RNA Catalysis. *Science*, 264(5167), 1924-1927. <https://doi.org/10.1126/science.8009223>

Qlark, L. C. J. (1956). MONITOR AND CONTROL OF BLOOD AND TISSUE OXYGEN TENSIONS. *ASAIO Journal*, 2(1), 41-48.

- Ranjbar, S., Shahrokhian, S., & Nurmohammadi, F. (2018). Nanoporous gold as a suitable substrate for preparation of a new sensitive electrochemical aptasensor for detection of *Salmonella typhimurium*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255, 1536-1544. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.160>
- Rapini, R., & Marrazza, G. (2017). Electrochemical aptasensors for contaminants detection in food and environment : Recent advances. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 118, 47-61. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.07.004>
- Ray, P., Viles, K. D., Soule, E. E., & Woodruff, R. S. (2013). Application of aptamers for targeted therapeutics. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 61(4), 255-271. <https://doi.org/10.1007/s00005-013-0227-0>
- Ray, P., & White, R. R. (2010). Aptamers for Targeted Drug Delivery. *Pharmaceuticals*, 3(6), 1761-1778. <https://doi.org/10.3390/ph3061761>
- Regulski, E. E., & Breaker, R. R. (2008). In-Line Probing Analysis of Riboswitches. In J. Wilusz (Éd.), *Post-Transcriptional Gene Regulation* (p. 53-67). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-033-1_4
- Reimhult, E., & Kumar, K. (2008). Membrane biosensor platforms using nano- and microporous supports. *Trends in Biotechnology*, 26(2), 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.11.004>
- Robertson, D. L., & Joyce, G. F. (1990). Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, 344(6265), 467-468. <https://doi.org/10.1038/344467a0>
- Rocchitta, G., Spanu, A., Babudieri, S., Latte, G., Madeddu, G., Galleri, G., Nuvoli, S., Bagella, P., Demartis, M. I., Fiore, V., Manetti, R., & Serra, P. A. (2016). Enzyme Biosensors for Biomedical Applications : Strategies for Safeguarding Analytical Performances in

- Biological Fluids. *Sensors* (Basel, Switzerland), 16(6), E780.
<https://doi.org/10.3390/s16060780>
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747-1763. <https://doi.org/10.1039/B714449K>
- Sakamoto, T., Oguro, A., Kawai, G., Ohtsu, T., & Nakamura, Y. (2005). NMR structures of double loops of an RNA aptamer against mammalian initiation factor 4A. *Nucleic Acids Research*, 33(2), 745-754. <https://doi.org/10.1093/nar/gki222>
- Savran, C., Knudsen, S. M., Ellington, A., & Manalis, S. (2004). Micromechanical detection of proteins using aptamer-based receptor molecules. *Analytical chemistry*. <https://doi.org/10.1021/AC049859F>
- Scheller, F. W., Wollenberger, U., Pfeiffer, D., & Schubert, F. (1996). Overview of Biosensor Technology. In E. E. Bittar, B. Danielsson, & L. Bülow (Éds.), *Advances in Molecular and Cell Biology* (Vol. 15, p. 353-363). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1569-2558\(08\)60119-8](https://doi.org/10.1016/S1569-2558(08)60119-8)
- Shah, N. A. (2020). *Development of RNA Aptamers through Supervised Learning and Capture-SELEX strategy* [Thesis]. <https://digital.lib.washington.edu:443/researchworks/handle/1773/46744>
- Shukla, D., Namperumalsamy, P., Goldbaum, M., & Cunningham Jr, E. T. (2007). Pegaptanib sodium for ocular vascular disease. *Indian Journal of Ophthalmology*, 55(6), 427-430.
- Silverman, S. K. (2009). Artificial Functional Nucleic Acids: Aptamers, Ribozymes, and Deoxyribozymes Identified by In Vitro Selection. In L. Yingfu & L. Yi (Éds.), *Functional Nucleic Acids for Analytical Applications* (p. 47-108). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-73711-9_3

- Simon, A. J., Vallée-Bélisle, A., Ricci, F., & Plaxco, K. W. (2014). Intrinsic disorder as a generalizable strategy for the rational design of highly responsive, allosterically cooperative receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(42), 15048-15053. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410796111>
- Sokolova, E., & Reiser, G. (2008). Prothrombin/thrombin and the thrombin receptors PAR-1 and PAR-4 in the brain: Localization, expression and participation in neurodegenerative diseases. *Thrombosis and Haemostasis*, 100(4), 576-581.
- Song, K.-M., Lee, S., & Ban, C. (2012). Aptamers and Their Biological Applications. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 12(1), 612-631. <https://doi.org/10.3390/s120100612>
- Song, M., Li, G., Zhang, Q., Liu, J., & Huang, Q. (2020). De novo post-SELEX optimization of a G-quadruplex DNA aptamer binding to marine toxin gonyautoxin 1/4. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3425-3433. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.041>
- Soulinac, C. (2018). *Modification de l'Isatine pour la fabrication de biocapteurs* [These de doctorat, Normandie]. <http://www.theses.fr/2018NORMR027>
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R. K., Racie, T., Rajeev, K. G., Röhl, I., Toudjarska, I., Wang, G., ... Vornlocher, H.-P. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 432(7014), 173-178. <https://doi.org/10.1038/nature03121>
- Stead, S. L., Ashwin, H., Johnston, B., Dallas, A., Kazakov, S. A., Tarbin, J. A., Sharman, M., Kay, J., & Keely, B. J. (2010). An RNA-aptamer-based assay for the detection and analysis of malachite green and leucomalachite green residues in fish tissue. *Analytical Chemistry*, 82(7), 2652-2660. <https://doi.org/10.1021/ac902226v>

- Stojanovic, M. N., de Prada, P., & Landry, D. W. (2001). Aptamer-Based Folding Fluorescent Sensor for Cocaine. *Journal of the American Chemical Society*, 123(21), 4928-4931. <https://doi.org/10.1021/ja0038171>
- Stoltenburg, R., Nikolaus, N., & Strehlitz, B. (2012). Capture-SELEX : Selection of DNA Aptamers for Aminoglycoside Antibiotics. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2012, e415697. <https://doi.org/10.1155/2012/415697>
- Stoltenburg, R., Reinemann, C., & Strehlitz, B. (2007). SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering*, 24(4), 381-403. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.06.001>
- Strehlitz, B., & Stoltenburg, R. (2009). Selex and Its Recent Optimizations. In *Aptamers in Bioanalysis* (p. 31-59). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470380772.ch2>
- Sun, Z.-Y., Wang, X.-N., Cheng, S.-Q., Su, X.-X., & Ou, T.-M. (2019). Developing Novel G-Quadruplex Ligands : From Interaction with Nucleic Acids to Interfering with Nucleic Acid–Protein Interaction. *Molecules*, 24(3), 396. <https://doi.org/10.3390/molecules24030396>
- Suzuki, S., Takahashi, F., Satoh, I., & Sonobe, N. (1975). Ethanol and Lactic Acid Sensors Using Electrodes Coated with Dehydrogenase—Collagen Membranes. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 48(11), 3246-3249. <https://doi.org/10.1246/bcsj.48.3246>
- Tasset, D. M., Kubik, M. F., & Steiner, W. (1997). Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *Journal of Molecular Biology*, 272(5), 688-698. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1275>
- Taylor, S. K., Pei, R., Moon, B. C., Damera, S., Shen, A., & Stojanovic, M. N. (2009). Triggered release of an active peptide conjugate from a DNA device by an orally administrable small

- molecule. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 48(24), 4394-4397.
<https://doi.org/10.1002/anie.200900499>
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors : Recommended definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics*, 16(1-2), 121-131. [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(01)00115-4)
- Tian, S., Yesselman, J. D., Cordero, P., & Das, R. (2015). Primerize : Automated primer assembly for transcribing non-coding RNA domains. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W522-W526.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv538>
- Tombelli, S., Minunni, M., & Mascini, M. (2005). Analytical applications of aptamers. *Biosensors & Bioelectronics*, 20(12), 2424-2434. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.11.006>
- Tombelli, S., Minunni, M., & Mascini, M. (2007). Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis. *Biomolecular Engineering*, 24(2), 191-200.
<https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.03.003>
- Tovar-Sánchez, E., Suarez-Rodríguez, R., Ramírez-Trujillo, A., Valencia-Cuevas, L., Hernández-Plata, I., & Mussali-Galante, P. (2019). The Use of Biosensors for Biomonitoring Environmental Metal Pollution. In *Biosensors for Environmental Monitoring*. IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.84309>
- Tran Minh, C. (1991). *Les biocapteurs : Principes, construction et applications*. Masson.
- Trilling, A. K., Beekwilder, J., & Zuilhof, H. (2013). Antibody orientation on biosensor surfaces : A minireview. *Analyst*, 138(6), 1619-1627. <https://doi.org/10.1039/C2AN36787D>
- Tsai, R. Y., & Reed, R. R. (1998). Identification of DNA recognition sequences and protein interaction domains of the multiple-Zn-finger protein Roaz. *Molecular and Cellular Biology*, 18(11), 6447-6456. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.11.6447>

- Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment : RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science*, 249(4968), 505-510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>
- Vianini, E., Palumbo, M., & Gatto, B. (2001). In vitro selection of DNA aptamers that bind L-tyrosinamide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9(10), 2543-2548. [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(01\)00054-2](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(01)00054-2)
- Vo-Dinh, T., & Cullum, B. (2000). Biosensors and biochips : Advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 366(6-7), 540-551. <https://doi.org/10.1007/s002160051549>
- Vo-Dinh, T., Cullum, B. M., & Stokes, D. L. (2001). Nanosensors and biochips : Frontiers in biomolecular diagnostics. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 74(1), 2-11. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(00\)00705-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(00)00705-X)
- Walter, J.-G., Stahl, F., & Scheper, T. (2012). Aptamers as affinity ligands for downstream processing. *Engineering in Life Sciences*, 12(5), 496-506. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100197>
- Wan, Y., Kim, Y., Li, N., Cho, S. K., Bachoo, R., Ellington, A. D., & Iqbal, S. M. (2010). Surface-Immobilized Aptamers for Cancer Cell Isolation and Microscopic Cytology. *Cancer Research*, 70(22), 9371-9380. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0568>
- Wang, C., Yang, G., Luo, Z., & Ding, H. (2009). In vitro selection of high-affinity DNA aptamers for streptavidin. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 41(4), 335-340. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmp022>
- Wang, Y.-X., Ye, Z.-Z., Si, C.-Y., & Ying, Y.-B. (2012). Application of Aptamer Based Biosensors for Detection of Pathogenic Microorganisms. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40(4), 634-642. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(11\)60542-2](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(11)60542-2)

- Wang, Z., Lee, J. H., & Lu, Y. (2008). Highly sensitive “turn-on” fluorescent sensor for Hg²⁺ in aqueous solution based on structure-switching DNA. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, *45*, 6005-6007. <https://doi.org/10.1039/b812755g>
- Wilson, B. D., Hariri, A. A., Thompson, I. A. P., Eisenstein, M., & Soh, H. T. (2019). Independent control of the thermodynamic and kinetic properties of aptamer switches. *Nature Communications*, *10*(1), 5079. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13137-x>
- Wochner, A., Menger, M., Orgel, D., Cech, B., Rimmel, M., Erdmann, V. A., & Glöckler, J. (2008). A DNA aptamer with high affinity and specificity for therapeutic anthracyclines. *Analytical Biochemistry*, *373*(1), 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.09.007>
- Wurster, S. E., & Maher, L. J. (2008). Selection and characterization of anti-NF-κB p65 RNA aptamers. *RNA*, *14*(6), 1037-1047. <https://doi.org/10.1261/rna.878908>
- Yao, C., Qi, Y., Zhao, Y., Xiang, Y., Chen, Q., & Fu, W. (2009). Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE. *Biosensors & Bioelectronics*, *24*(8), 2499-2503. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.12.036>
- Yin, J., Zhang, A., Dong, C., & Ren, J. (2015). An aptamer-based single particle method for sensitive detection of thrombin using fluorescent quantum dots as labeling probes. *Talanta*, *144*, 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.034>
- Yu, D., Blankert, B., Viré, J., & Kauffmann, J. (2005). Biosensors in Drug Discovery and Drug Analysis. *Analytical Letters*, *38*(11), 1687-1701. <https://doi.org/10.1080/00032710500205659>
- Zeng, G., Zhang, C., Huang, D., Lai, C., Tang, L., Zhou, Y., Xu, P., Wang, H., Qin, L., & Cheng, M. (2017). Practical and regenerable electrochemical aptasensor based on nanoporous gold and thymine-Hg²⁺-thymine base pairs for Hg²⁺ detection. *Biosensors and Bioelectronics*, *90*, 542-548. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.018>

- Zhang, P., Zhao, N., Zeng, Z., Chang, C.-C., & Zu, Y. (2010). Combination of an aptamer probe to CD4 and antibodies for multicolored cell phenotyping. *American Journal of Clinical Pathology*, *134*(4), 586-593. <https://doi.org/10.1309/AJCP55KQYWSGZRKC>
- Zhou, W., Huang, P.-J. J., Ding, J., & Liu, J. (2014). Aptamer-based biosensors for biomedical diagnostics. *The Analyst*, *139*(11), 2627-2640. <https://doi.org/10.1039/c4an00132j>
- Zhu, Q., Liu, G., & Kai, M. (2015). DNA Aptamers in the Diagnosis and Treatment of Human Diseases. *Molecules*, *20*(12), 20979-20997. <https://doi.org/10.3390/molecules201219739>

