

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

SELECTION D'APTAMERES CONTRE DES MOLECULES HYDROPHOBES DERIVEES DE DROGUES

Par
Rihab Rouag

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

Annie Castonguay
INRS-IAFSB

Examineur externe

Maureen McKeague
Département de chimie
Université McGill

Directeur de recherche

Jonathan Perreault
INRS-IAFSB

REMERCIEMENTS

Dans cette partie de mon mémoire, je tiens à exprimer ma reconnaissance et ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont aidé de loin ou de près dans la réalisation de ce projet. D'ailleurs, sortir de ta zone de confort et vivre dans l'autre partie du monde, est une belle expérience où tu peux apprendre beaucoup de choses.

Je remercie tout d'abord, mon directeur de recherche Jonathan Perreault pour son encadrement et sa disponibilité tout au long de ma maîtrise. Aussi bien ses qualités humaines et sa compréhension.

Je remercie aussi les professeures Annie Castonguay et Maureen McKeague d'avoir accepté de consacrer le temps pour examiner mon mémoire.

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

J'exprime mes vifs remerciements à mes amis, Asma, Azer, Sabrine et Sarra, ma deuxième famille au Canada. Grâce à eux j'ai passé de bons moments.

Mes plus profonds remerciements à ma famille, mon père Mokhtar, ma mère Jamila, mes deux sœurs Khouloud et Abir, mon frère Ala et ma tante Nafissa pour leur soutien et support tout le long de mon parcours.

RÉSUMÉ

Les aptamères sont des oligonucléotides ayant la capacité de lier spécifiquement et avec une haute affinité des molécules. Ils sont utilisés comme agents de reconnaissance et de détection de certaines substances. Les aptamères interagissent souvent avec leurs ligands, typiquement hydrophiles, via des liaisons hydrogène. Cependant, de nombreuses drogues, ou dérivés de drogues, sont hydrophobes, tels que le THC issu du cannabis ou le méthyl benzoate issu de la cocaïne, d'où la nécessité d'utiliser des aptamères modifiés pour la mise au point de biocapteurs pour la détection de drogues. Pour améliorer la liaison des aptamères avec les molécules hydrophobes, nous modifions les bibliothèques d'ADN par une réaction de chimie click en ajoutant une molécule hydrophobe (le 7-(diéthylamino) coumarin-3-carbonyl azide). Ces bibliothèques ont été utilisées pour identifier des aptamères par des stratégies SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*). Après des cycles de sélection en utilisant des billes magnétiques conjuguées au méthyl benzoate, nous avons observé une évolution de l'enrichissement du SELEX et identifié deux séquences d'aptamères potentiels.

En parallèle, nous avons testé une méthode développée au sein de notre laboratoire, le SR-PAGE (*Shifted-Reverse PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) pour l'utiliser comme étape de sélection au cours de processus de SELEX. Nous avons validé la méthode en utilisant des riboswitchs connus afin d'établir des contrôles positifs permettant l'utilisation du SR-PAGE pour la sélection d'aptamères contre des drogues.

Mots-clés : SR-PAGE, Aptamère, SELEX, Molécule hydrophobe, ADN modifié, méthyl benzoate

ABSTRACT

Aptamers are oligonucleotides with the ability to bind molecules with high affinity and specificity. They are used as agents of recognition and detection of certain substances. Typically, aptamers interact with their ligands through hydrogen bonds, implying that ligands are polar molecules. However, many drugs or drug-derived molecules are hydrophobic, such as THC from cannabis or methyl benzoate from cocaine. It is difficult to bind such molecules with a conventional aptamer, hence the need to use modified aptamers for the development of drug-detection biosensors. To favor the formation of a binding pocket for hydrophobic molecules, we modified DNA using click chemistry to add a hydrophobic moiety to the PCR-amplified DNA libraries. These libraries can be used to identify aptamers by SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) strategies. After cycles of selection using methyl benzoate-conjugated magnetic beads, we observed an evolution of SELEX enrichment and we identified two potential aptamer sequences.

In parallel, we tested a method developed in our laboratory, the SR-PAGE (Shifted-Reverse Polyacrylamide Gel Electrophoresis) for its use as a selection step during SELEX. We validated the method using known riboswitches to establish positive controls allowing the use of SR-PAGE for the selection of aptamers against drugs.

Keywords : SR-PAGE, Aptamer, SELEX, Hydrophobic molecule, modified DNA, methyl benzoate

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XI
1 INTRODUCTION	1
1.1 LE CANNABIS	1
1.1.1 Effets du cannabis sur l'Homme.....	1
1.1.2 Légalisation du cannabis au Canada	2
1.1.3 Composition du cannabis	2
1.1.4 Pharmacocinétique de THC et ses métabolites.....	3
1.1.5 Dépistage du cannabis dans les liquides biologiques.....	6
1.1.6 Méthodes de détections.....	8
1.2 LA COCAÏNE	10
1.2.1 La cocaïne et le trafic.....	10
1.2.2 Les technologies de détection	10
1.2.3 Les molécules caractéristiques de la cocaïne.....	10
1.3 LES APTAMERES.....	12
1.3.1 Caractéristiques générales des aptamères.....	12
1.3.2 Les avantages des aptamères	12
1.3.3 Les aptamères modifiés.....	14
1.3.4 Les applications des aptamères.....	17
1.4 SELEX	20
1.4.1 Généralité sur le SELEX.....	20
1.4.2 Les méthodes de SELEX.....	21
2 PROBLEMATIQUES, HYPOTHESES ET OBJECTIFS	24
3 MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
3.1 SELECTION DES APTAMERES CONTRE LE METHYL BENZOATE	26

3.1.1	Conception de la librairie et d'amorces pour SELEX.....	26
3.1.2	Modification de la librairie modifiée par chimie click	27
3.1.3	Immobilisation de molécules de méthyl 4-ethynylbenzoate sur des billes azides magnétiques.....	28
3.1.4	Processus de la sélection in vitro	29
3.1.5	Amplification avec des amorces inégales	33
3.1.6	Purification sur un gel de polyacrylamide dénaturant	34
3.1.7	Test d'affinité des générations.....	34
3.1.8	Séquençage à haut débit.....	35
3.1.9	Séquençage Sanger	36
3.1.10	Analyses bio-informatiques	37
3.1.11	Détermination de la constante de dissociation Kd de deux clones	38
3.2	SR-PAGE UNE NOUVELLE METHODE DE SELECTION.....	39
3.2.1	Principe et méthodologie	39
3.2.2	Synthèse in vitro de l'ADN matrice du riboswitch glycine par PCR d'assemblage 41	
3.2.3	Visualisation des produits de PCR.....	43
3.2.4	Transcription chaude	43
4	RESULTATS.....	45
4.1	SELECTION DES APTAMERES CONTRE LE METHYL BENZOATE	45
4.1.1	Conception de la librairie d'ADN pour le SELEX	45
4.1.2	Modification de la librairie d'ADN par chimie click	46
4.1.3	Immobilisation de molécules du méthyl 4-ethynylbenzoate sur des billes azides magnétiques.....	47
4.1.4	PCR avec des amorces inégales	48
4.1.5	Test d'affinité.....	49
4.1.6	Séquençage Sanger	51
4.1.7	Prédiction de la structure secondaire.....	52
4.1.8	Détermination de la constante de dissociation de deux clones par fluorescence	54
4.1.9	Analyse des résultats de séquençage à haut débit	55
4.2	SR-PAGE UNE NOUVELLE METHODE DE SELECTION.....	57
4.2.1	Création de différentes constructions de riboswitchs connus.....	57
4.2.2	Synthèse in vitro de l'ADN matrice de riboswitch glycine	58
4.2.3	Migration SR-PAGE des riboswitchs connus.....	59

5	DISCUSSION	62
5.1	SELECTION DES APTAMERES CONTRE LE METHYL BENZOATE	62
5.2	SR-PAGE UNE NOUVELLE METHODE DE SELECTION.....	63
6	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	65
7	BIBLIOGRAPHIE	66
8	ANNEXES	72

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 : Les différents composés du cannabis.	2
Figure 1-2: Structure chimique de 2 isomères le Δ -9-tetrahydrocannabinol et le Δ -8-tetrahydrocannabinol. Tiré de (Sharma et al., 2012).	3
Figure 1-3: Concentrations en Δ 9-THC et effets physiques et psychiques « ressentis » par le sujet en fonction du temps, après consommation d'un « joint » contenant 9 mg de Δ 9-THC. Tiré de (Harder & Rietbrock, 1997).	4
Figure 1-4: Métabolisme oxydatif du Δ 9-THC et ses différents métabolites. Tiré de (Garrett, 1979).....	5
Figure 1-5: Pharmacocinétique de THC dans le corps humain adapté de EUPATI (Académie européenne des patients).....	6
Figure 1-6: Le test salivaire DrugWipe 5S pour le dépistage des drogues. Tiré de (Louis Blouin, 2017)....	9
Figure 1-7: La décomposition de la molécule de la cocaïne. Tiré de (Lai et al., 2008).....	11
Figure 1-8 : Structure moléculaire de 12 nucléosides. Tiré de (Sefah et al., 2014)	15
Figure 1-9 : Structure moléculaire de la paire non naturelle (d5SICS-dNaM) par rapport à la paire de bases naturelles (dG-dC).....	16
Figure 1-10 : Détection de la présence de la cocaïne par un changement de la conformation de l'aptamère. Adapté de (Cekan et al., 2009)	18
Figure 1-11 : Schéma du principe d'évolution systématique des ligands par procédé d'enrichissement Exponentiel (SELEX).	20
Figure 1-12 : Représentation schématique de la librairie utilisée en Capture-SELEX.	21
Figure 1-13 : Principe fondamental de sélection en utilisant CE-SELEX. Tiré de (Song et al., 2012).	22
Figure 3-1: Structure du nucléotide modifié d'U*TP.	26
Figure 3-2: La conjugaison entre la molécule hydrophobe et l'ADN modifié.....	28
Figure 3-3: Représentation schématique de la réaction de chimie click entre les billes et le Méthyl 4-ethynylbenzoate.	29
Figure 3-4: Représentation schématique de processus de sélection in vitro SELEX	30
Figure 3-5: Principe de PCR avec amorces de longueur inégale.....	33
Figure 3-6: Le plasmide pGEM®-T utilisé pour le clonage des inserts. Tiré de (Promega, 2018).....	36
Figure 4-1: Conception de la librairie et d'amorces pour SELEX.	45

Figure 4-2: Séparation et purification de la librairie d'ADN après modification par chimie click.....	46
Figure 4-3: Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de méthyl 4-ethynylbenzoate.	47
Figure 4-4: Visualisation des produits de PCR	48
Figure 4-5: Purification par électrophorèse sur un PAGE des oligonucléotides marqué avec ³² P.	49
Figure 4-6: Évolution de l'affinité des librairies durant le SELEX.....	50
Figure 4-7: Résultat de séquençage Sanger pour un clone de la librairie d'ADN modifié.	51
Figure 4-8: Résultat de l'alignement des séquences.	52
Figure 4-9: Structure secondaire de deux séquences d'aptamère.	53
Figure 4-10: Capture d'écran du résultat d'analyse de la séquence d'Apt 2 par le logiciel G4Hunter.	54
Figure 4-11 : Affinité des aptamères pour le méthyl benzoate.	54
Figure 4-12: Capture d'écran de l'interface de logiciel Aptasuite.	56
Figure 4-13 : Représentation schématique de différentes constructions de riboswitchs. Adapté de (Edwards & Batey, 2010).	57
Figure 4-14: Visualisation de de produit de PCR par le GelDoc.....	58
Figure 4-15: Scan des gels de SR-PAGE.....	60
Figure 4-16: scan d'un gel de SR-PAGE en présence de plusieurs ligands à la fois.....	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1: Les différentes formes de cannabis et leurs modes de consommation.	1
Tableau 1-2 : Les caractéristiques principales des différents liquides biologiques et leurs intérêts dans le dépistage des métabolites du cannabis (Inserm, 2001).	8
Tableau 1-3: Comparaison aptamère et anticorps. Adapté de (Walter et al., 2012).....	14
Tableau 1-4 : Exemples d'aptamères utilisés pour l'administration de médicaments (Zhang et al., 2019)	19
Tableau 1-5: Principaux avantages et inconvénients de méthodes de SELEX couramment utilisées (Zhang et al., 2019).	23
Tableau 3-1: Séquences utilisées au cours du SELEX pour la librairie modifiée.	26
Tableau 3-2: Séquences utilisées au cours du SELEX pour la librairie classique.	27
Tableau 3-3: Résumé des tours de SELEX de l'ADN modifié.	31
Tableau 3-4: Résumé des tours de SELEX de l'ADN classique.....	32
Tableau 3-5: Programme de la réaction de PCR.....	33
Tableau 3-6: Séquences des amorces utilisées lors du séquençage Sanger.....	37
Tableau 3-7: Préparation des échantillons de SR-PAGE.....	40
Tableau 3-8: Concentrations des ligands pulvérisés sur le gel.	41
Tableau 3-9: Séquences utilisées pour la synthèse de l'ADN matrice du riboswitch glycine.....	43
Tableau 4-1: Valeurs d'absorbance optique, de concentration et de nombre de mole de méthyl 4-ethynylbenzoate dans le surnageant et les deux lavages.	48
Tableau 4-2: Séquences d'aptamères potentiels issus de la librairie modifiée.	52
Tableau 4-3: Séquence complète de riboswitch glycine.....	58

LISTE DES ABRÉVIATIONS

^{32}P : Radioisotope du phosphore
11-OH-THC: 11-hydroxy-tétrahydrocannabinol
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNsb : Acide Désoxyribonucléique simple brin
AFM-SELEX : Microscopie à force atomique-SELEX
BPB : Bleu de bromophénol
APS : Persulfate d'ammonium
CBD: Cannabidiol
CBN: Cannabinol
C-di-GMP : Di-guanosine monophosphate cyclique
CE-SELEX: Électrophorèse capillaire-SELEX
CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
DTT : Dithiothréitol
EDME : Ester méthylique d'ecgonidine
EDTA: Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique
H: Heure
EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique
HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
SIGAE : Système d'information génétique artificiellement étendu
SMI : Spectrométrie de mobilité ionique
IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
Kd : Constante de Dissociation
MB : Méthyl 4-éthynylbenzoate
Min : Minute
MST : Thermophorèse à micro-échelle (*microscale thermophoresis*)
M-SELEX: SELEX microfluidique
OTA : Ochratoxine A
PAGE : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PCR : Réaction de Polymérase en Chaîne
PEG: Poly éthylène glycol
PSMA : Antigène membranaire spécifique de prostate
PTK7 : Protéine tyrosine kinase-7

rNTP : Ribonucléoside tri-phosphate
rUTP : Uracile triposphate
Rpm : Rotations par minute
SELEX : Enrichissement Systématique de Ligands par Amplification Exponentielle
SOC : Super Optimal Broth
SPR : Résonance plasmonique
SR-PAGE : Shifted-Reverse PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TAE : Tris Acétate EDTA
TBE : Tris Borate EDTA
TBMg : Tris-Borate Magnésium
TEMED : TEtraMéthylEthylèneDiamine
THC : Δ -9-tetrahydrocannabinol
THC-COOH: 11-nor-9-carboxy- Δ 9-tétrahydrocannabinol
TPP: Thiamine Pyrophosphate
TRX : Tampon de transcription
U*TP : 5-Ethynyl-2'deoxyuridine 5'-triphosphate
VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
XC : Bleu de xylène de cyanol

1 INTRODUCTION

1.1 Le cannabis

Le cannabis est l'une des substances psychotropes les plus fréquemment consommées dans le monde, par inhalation sous forme de cigarette ou par voie orale sous forme d'huile ou beurre en l'ajoutant à certaines liqueurs ou aliments comme les gâteaux. Le **Tableau 1.1** résume les différentes formes, sources et mode de consommation du cannabis (Mendelson & Mello, 1984).

Tableau 1-1: Les différentes formes de cannabis et leurs modes de consommation.

Forme	Source	Méthode de consommation
Marijuana	Feuilles séchées, tiges, fleurs et graines	Fumé comme joint
Bhang	Feuilles fraîches et tige	Mélangé à des aliments et consommé par voie orale
Huile de haschisch	Feuilles, graines, tiges et fleurs imbibées d'huile / de solvant	Fumé comme joint ou consommé par voie orale

1.1.1 Effets du cannabis sur l'Homme

Les effets comportementaux et physiologiques du cannabis, dépendent tout d'abord de la personne aussi bien que de la quantité consommée, dont les principaux sont (Devane *et al.*, 1992) :

- Relaxation
- Accentuation des perceptions sensorielles
- Manque de concentration et de l'attention
- Diminution de l'équilibre et de la coordination des mouvements
- Hallucinations
- Vasodilatation et diminution du rythme respiratoire
- Changement du rythme cardiaque

1.1.2 Légalisation du cannabis au Canada

En octobre 2018, le Canada a légalisé la consommation du cannabis à des buts non médicaux malgré que 30 % des accidents routiers chez les jeunes de 16 à 25 ans, au Québec, sont liés à une consommation du cannabis (Tétreault, 2018). Le code criminel canadien interdit la conduite avec des facultés affaiblies par la drogue, des sanctions aux infractions liées à la conduite de véhicule sous l'effet de la drogue pour un seuil de plus de 2 ng de THC/mL du sang sont prévues par la loi (Tétreault, 2018).

1.1.3 Composition du cannabis

La plante du cannabis contient environ 400 composés chimiques (Sharma *et al.*, 2012), divisés en deux groupes (**Figure 1.1**), les non cannabinoïdes qui sont majoritaires et les cannabinoïdes qui sont des molécules terpéniques possédant un noyau phénol. Ce sont des molécules hydrophobes insolubles dans l'eau. Les principaux sont le Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC) et son isomère le Δ -8-tetrahydrocannabinol (**Figure 1.2**), de même que le cannabidiol (CBD) et le cannabinoïde (CBN).

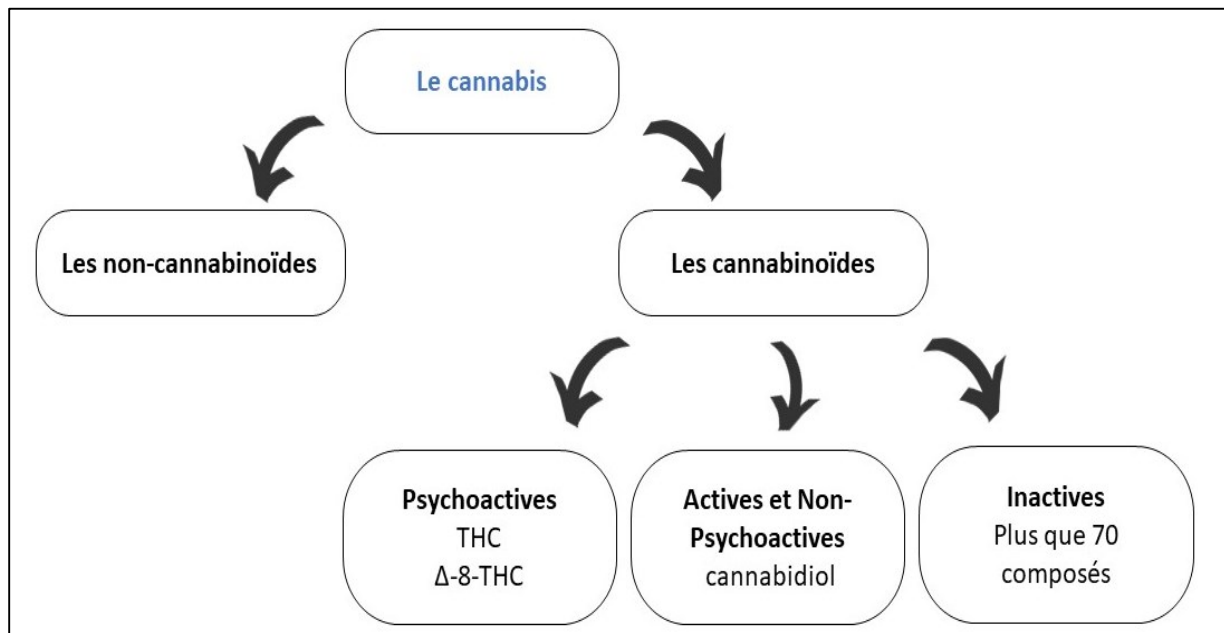


Figure 1-1 : Les différents composés du cannabis.

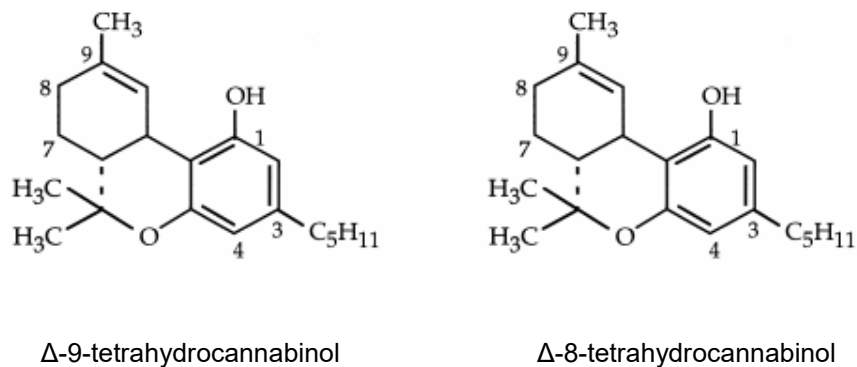


Figure 1-2: Structure chimique de 2 isomères le Δ -9-tetrahydrocannabinol et le Δ -8-tetrahydrocannabinol.
Tiré de (Sharma et al., 2012).

L'effet psychotrope du cannabis est lié principalement au THC, il est considéré comme le principe actif. Les métabolites principaux du THC sont le 11-hydroxy-tétrahydrocannabinol (11-OH-THC), composé actif qui présente aussi un effet psychotrope et un composé inactif, le 11-nor-9-carboxy- Δ 9-tétrahydrocannabinol (THC-COOH).

1.1.4 Pharmacocinétique de THC et ses métabolites

- **Absorption et distribution**

Après une inhalation, sous forme de fumée, la biodisponibilité du THC est de l'ordre de 15 à 50% ce qui signifie que 15 à 50% du THC présent dans le joint sont absorbés par l'organisme. Cette absorption est extrêmement rapide, le pic maximal est obtenu 7 à 10 min après le premier souffle (Harder & Rietbrock, 1997).

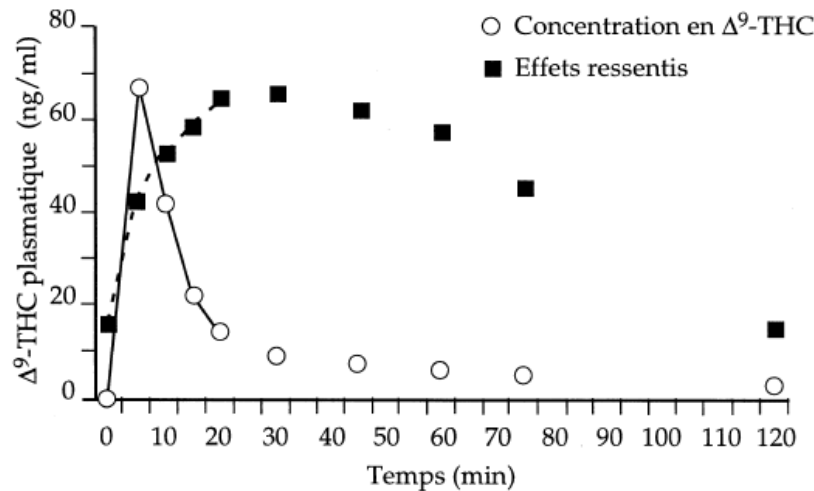


Figure 1-3: Concentrations en Δ⁹-THC et effets physiques et psychiques « ressentis » par le sujet en fonction du temps, après consommation d'un « joint » contenant 9 mg de Δ⁹-THC. Tiré de (Harder & Rietbrock, 1997).

Les résultats présentés dans la **Figure 1-3**, montrent que l'effet psychotrope après une consommation d'un « joint » contenant 9 mg de Δ⁹-THC dure pendant 2h. La concentration sanguine de THC diminue rapidement à cause de sa forte distribution dans les tissus adipeux grâce à sa lipophilie.

La durabilité des effets psychotropes peut correspondre à divers phénomènes :

- La durée nécessaire pour la fixation du THC sur ses récepteurs au niveau du cerveau.
- La transformation de THC en 11-OH-THC, dont sa fixation à l'albumine (Schou *et al.*, 1977) accélère sa pénétration cérébrale par rapport au THC fixé à des lipoprotéines.

Le décalage entre les deux pics de concentration sanguine de THC et l'effet ressenti peut être expliqué par le temps nécessaire pour que le THC dépasse la barrière hémato-encéphalique (Aguirell *et al.*, 1986).

- **Métabolisme**

Dans le foie, et spécifiquement au niveau des microsomes hépatiques, le THC subit une transformation oxydative (**Figure 1-4**). En effet, le THC est rapidement transformé en 11-OH-THC, et apparaît dans le sang 20 min après l'inhalation, présentant aussi un effet psychoactif. Ensuite ce dernier est oxydé pour donner le THC-COOH, un composé acide non actif observé 2h après l'inhalation (Huestis *et al.*, 1992).

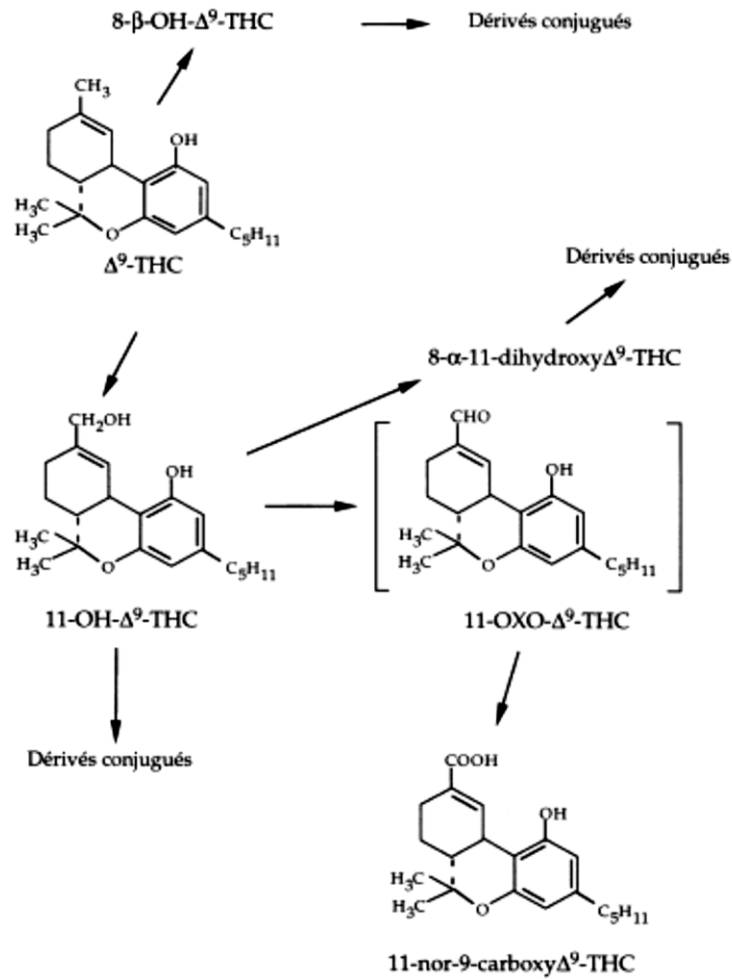


Figure 1-4: Métabolisme oxydatif du $\Delta^9\text{-THC}$ et ses différents métabolites. Tiré de (Garrett, 1979)

- **L'élimination**

L'élimination des cannabinoïdes et ses métabolites se fait principalement par voie rénale, sudorale et biliaire. En effet le THC est éliminé dans les urines et les selles principalement sous forme de THC-COOH (Hunt & Jones, 1980). Pour les consommateurs réguliers du cannabis des traces de THC peuvent être trouvées dans le sang même après 13 jours de la dernière prise. Des études ont prouvé aussi que le métabolite final THC-COOH peut rester dans les urines 27 jours après la dernière consommation à cause de sa cumulation au niveau des tissus adipeux (Smith-Kielland *et al.*, 1999).

Le schéma ci-dessous résume la pharmacocinétique de THC.

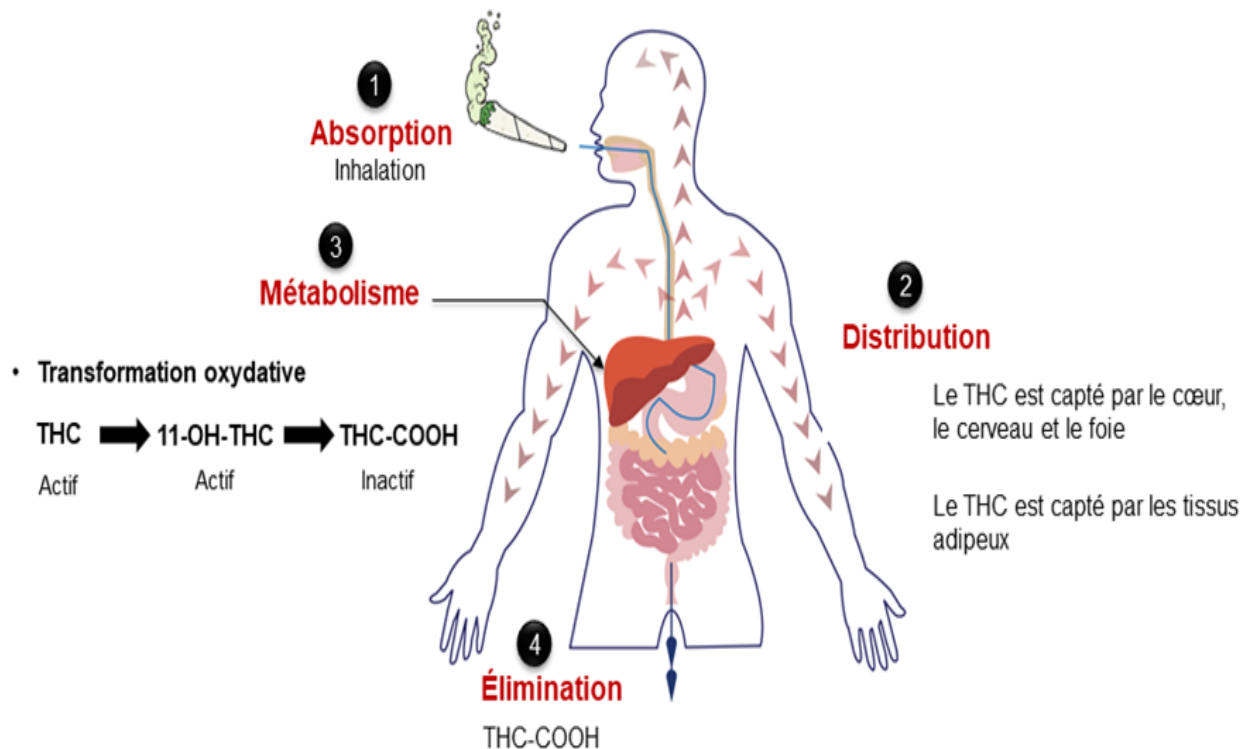


Figure 1-5: Pharmacocinétique de THC dans le corps humain adapté de EUPATI (Académie européenne des patients).

1.1.5 Dépistage du cannabis dans les liquides biologiques

La détection d'une consommation du cannabis peut être faite en utilisant principalement trois liquides biologiques : la salive, les urines et le sang.

• L'urine

Pour détecter une consommation de cannabis, l'urine est utilisée comme matrice biologique en dosant la quantité de THC-COOH, soit le principal métabolite de THC. Le dépistage au niveau des urines ne présente pas d'intérêt surtout dans la situation de dépistage lors de la conduite avec des facultés affaiblies par la drogue. En effet le THC-COOH peut être détecté dans les urines moyennement après 3 à 4h d'une consommation et il peut rester jusqu'à une semaine pour une consommation occasionnelle et 30 jours dans le cas d'un consommateur régulier (Musshoff & Madea, 2006).

En conclusion, pour détecter une consommation récente de THC l'utilisation de l'urine comme matrice n'est pas appropriée. Néanmoins, la détection de THC-COOH dans les urines peut

donner seulement une idée sur un usage passé de THC car les marges de détection dépassent les marges d'intoxication ou l'effet psychotrope.

- **La salive**

La salive est considérée comme une matrice idéale pour le dépistage à cause de la simplicité d'échantillonnage, l'aspect non invasif et surtout la présence de THC dans la cavité buccale due au phénomène de séquestration buccodentaire au moment de l'absorption (Cone, 1993) ce qui prouve une consommation récente détectable jusqu'à 2 à 10h.

- **Le sang**

Le sang est considéré comme la matrice biologique où tous les métabolites de THC peuvent être détectés. Le THC est détectable dans le sang après quelques secondes de la première prise jusqu'à 6h (Huestis *et al.*, 1992), jusqu'à 11h pour le 11-OH-THC et jusqu'à 156 h pour le THC-COOH.

D'ailleurs des études ont pu estimer le temps de la dernière consommation (Huestis *et al.*, 1992b), en se basant sur des relations mathématiques entre les différentes concentrations sanguines de chaque métabolite (voir Annexe).

L'utilisation de cette matrice au niveau des barrières policières n'est pas applicable, mais dans un contexte médico-juridique seules les analyses sanguines, réalisées avec des techniques spécifiques, peuvent différencier les différents métabolites et aussi bien les quantifier. Ce qui explique leur utilisation comme confirmation après le résultat d'un test salivaire.

Le tableau 1.2 résume les différentes matrices biologiques, leurs métabolites majoritaires, leurs délais maximums de détection et leurs intérêts au niveau du dépistage.

Tableau 1-2 : Les caractéristiques principales des différents liquides biologiques et leurs intérêts dans le dépistage des métabolites du cannabis (Inserm, 2001).

Matrice biologique	Cannabinoïdes majoritaires	Délai maximum de détection	Intérêt
Urine	THC-COOH (inactif)	Consommation occasionnelle : 2 à 7 jours Consommation régulière : 7 à 30 jours	Dépistage d'une consommation passée
La salive	THC (actif)	2 à 10h après la première inhalation	Dépistage d'une consommation récente
Le sang	THC 11-OH-THC THC-COOH	Jusqu'à 6h 2 à 11h Jusqu'à 156 h	Identification, confirmation, dosage et quantification

1.1.6 Méthodes de détections

- **Test salivaire**

L'instrument DrugWipe 5S fourni par la compagnie de SECURETEC (Louis Blouin, 2017) (**Figure 1.6**) a été en cours d'essai par les policiers au niveau des barrières routières au Canada. C'est un test salivaire simple d'utilisation qui permet la détection de cannabis, opiacés, cocaïne, amphétamines et méthamphétamines. Le principe du test consiste à la fixation de drogue sur son anticorps spécifique indiquant un couleur rouge en cas de positivité du test (Securetec Detektions-Systeme AG, 2014).

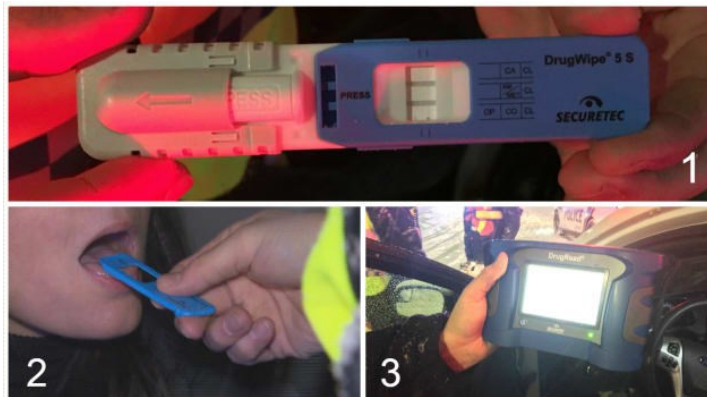


Figure 1-6: Le test salivaire DrugWipe 5S pour le dépistage des drogues. Tiré de (Louis Blouin, 2017)

Les inconvénients de ce test :

- Dans ce test immunologique, les anticorps ne sont pas spécifiques pour une molécule. Ces immuno-essais peuvent détecter plusieurs métabolites des drogues de la même famille ou des métabolites de structure différentes, ce qui amène à des résultats faussement positifs (Wilson & Smith, 1999). Entre autres, l'instrument DrugWipe ne peut différencier entre le THC et son métabolite le THC-COOH (Samyn & Van Haeren, 2000).
- La température d'utilisation, le test peut être utilisé dans une plage de température de 5 à 40°C (Securetec Detektions-Systeme AG, 2014), alors qu'en hiver les températures sont trop basses.

- **Les tests de confirmation**

Pour avoir des résultats pertinents, des techniques ont été développées pour détecter et quantifier à la fois les métabolites des drogues avec une grande sensibilité et spécificité.

Parmi ces techniques on cite :

- Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) : présente une haute spécificité et sensibilité, elle permet de différencier le THC et le THC-COOH dans les échantillons du sang (Huestis & Smith, 2018).
- Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie (LC-MS/MS)
- Spectrométrie de masse avec haute résolution.

1.2 La cocaïne

La cocaïne est un alcaloïde extrait à partir des feuilles d'*Erythroxylum.coca* (Johnson *et al.*, 2005), elle a l'aspect d'une poudre blanche. Elle est un stimulant du système nerveux central et provoque une dépendance physiologique.

1.2.1 La cocaïne et le trafic

La recherche du trafic des substances illégales dans les conteneurs commerciaux sans retarder le traitement de la douane présente un défi pour le gouvernement. En effet, les fausses alertes peuvent engendrer une problématique en termes de temps et d'argent perdus. D'où la nécessité d'avoir un système de contrôle capable de détecter d'une manière rapide et sélective la présence ou l'absence des substances illicites (Chalmers, 2007).

1.2.2 Les technologies de détection

Les technologies de détection de traces de drogues les plus couramment utilisées sont :

- La spectrométrie de mobilité ionique (SMI) est une technique permettant de détecter les traces de produits chimiques gazeux sous forme de vapeur. En effet les vapeurs de composés s'accumulent dans l'espace libre dans les conteneurs et sont transformées en ions à la pression atmosphérique pour être identifiés grâce à leurs mobilités en phase gazeuse dans un champs électrique (Ewing *et al.*, 2001).
- Les chiens détecteurs de drogues sont généralement justes et sensibles, mais ne sont pas capables de travailler une longue période. Ils ont besoin d'un entraînement spécifique aussi bien que d'un entraîneur lors du contrôle. De plus, ils peuvent être influencés de la part de leurs entraîneurs (Lai *et al.*, 2008; Lorenzo *et al.*, 2003).

1.2.3 Les molécules caractéristiques de la cocaïne

La décomposition de la molécule de la cocaïne génère principalement deux composés : le méthyl benzoate et l'ester méthylique d'ecgonidine (EDME) (**Figure 1.7**). Les deux molécules se trouvent dans l'espace libre, majoritairement le méthyl benzoate, grâce à leurs pressions de vapeur élevées reflétant leurs volatilités. La formation de méthyl benzoate nécessite deux étapes, une première d'hydrolyse de deux groupements ester pour former le méthanol et l'acide benzoïque suivie d'une estérification afin de générer le méthyl benzoate (Lai *et al.*, 2008).

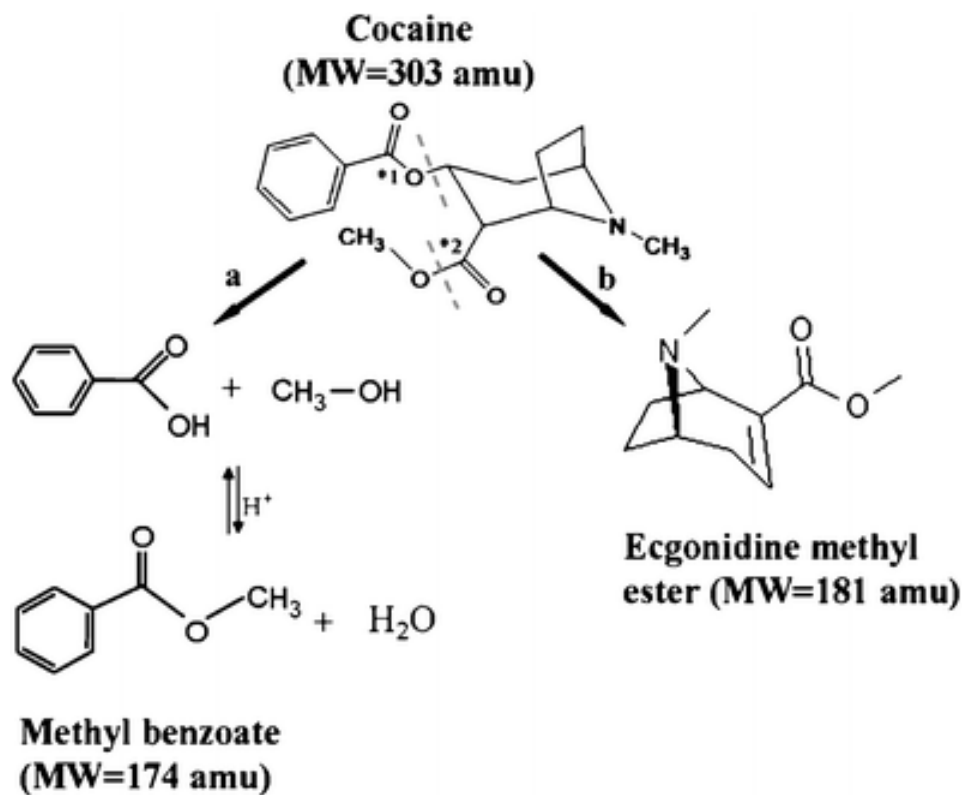


Figure 1-7: La décomposition de la molécule de la cocaïne. Tiré de (Lai et al., 2008)

Le méthyl benzoate est considéré comme le marqueur chimique volatil de la cocaïne. En effet, c'est la même odeur que les chiens détecteurs de drogues sont entraînés à détecter pour révéler sa présence dans les bagages ou dans les grands conteneurs d'importation et d'exportation (Furton *et al.*, 2002).

1.3 Les aptamères

1.3.1 Caractéristiques générales des aptamères

Les aptamères sont des oligonucléotides simple brin ADN ou ARN, formant des pochettes de liaison dans leurs structures tridimensionnelles et dont la taille varie de 6 à 40 kDa. Ils présentent une capacité de se lier à une cible d'intérêt (de petites molécules organiques, des saccharides, des peptides, des virus, des cellules...) avec une haute affinité et spécificité grâce à des interactions de Van Der Waals, des liaisons hydrogène, des interactions électrostatiques ou une combinaison de ces interactions. Ces derniers sont générés par une méthode nommée SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) à partir d'une librairie d'acides nucléiques complexes (Ellington & Szostak, 1990; Tuerk & Gold, 1990). Le processus sera décrit en détail à la section 1.4.

Les aptamères présentent typiquement des constantes de dissociation (K_d) de l'ordre du micromolaire, parfois jusqu'au nanomolaire (Kaushik & Dixit, 2016), qui reflètent leur affinité vis-à-vis la cible. Plus le K_d est faible plus l'affinité de l'aptamère est importante.

1.3.2 Les avantages des aptamères

Les anticorps sont connus comme étant la classe de molécules la plus utilisée pour la reconnaissance moléculaire dans plusieurs applications biologiques. Les aptamères présentent plusieurs avantages comparativement aux anticorps, tels que :

- La haute stabilité : les anticorps sont des peptides à la base, ils peuvent subir une dénaturation irréversible à haute température, par contre les oligonucléotides sont plus stables thermiquement.
- Le mode de production et de sélection : la production des anticorps est un processus coûteux, laborieux et nécessitant un sacrifice d'animaux (Birch & Racher, 2006). Tandis que l'immunisation *in vivo* n'est pas nécessaire pour la synthèse d'aptamères puisqu'ils sont sélectionnés et générés par un processus de sélection *in vitro* (SELEX) avec une grande pureté et reproductibilité. Les paramètres de sélection des aptamères peuvent être ajustés afin d'améliorer la stabilité et contrôler leurs liaisons avec leurs cibles. De plus des molécules signal comme des fluorophores et des extincteurs peuvent être introduits à des sites qui facilitent le développement des biocapteurs (Ferreira & Missailidis, 2007; Jayasena, 1999).

- Faible immunogénicité: les aptamères ne sont pas considérés comme des molécules immunogènes pour le système immunitaire humain (Ireson & Kelland, 2006). Des études de la compagnie Eyetech ont montré qu'un aptamère spécifique du VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) présente un effet immunogène inférieur à celui des anticorps monoclonaux car ces derniers sont des protéines humanisées qui contiennent encore des séquences résiduelles de souris ((Group, 2002; Group, 2003).
- Variété des cibles : il est difficile de sélectionner et produire des anticorps contre des molécules ou toxines présentant un pouvoir immunogène faible, cependant les aptamères peuvent être générés en quantité suffisante. Ils peuvent être sélectionnés contre des molécules très simples et contre lesquelles il n'est pas possible de produire des anticorps, comme des ions métalliques par exemple (Jayasena, 1999).

Le tableau ci-dessous résume les grandes différences entre les aptamères et les anticorps.

Tableau 1-3: Comparaison aptamère et anticorps. Adapté de (Walter *et al.*, 2012)

Les anticorps	Les aptamères
Leur production nécessite des animaux	Identification via des méthodes de sélection <i>in vitro</i> , applicable pour tout type de cible
La production <i>in vivo</i> provoque une variation d'un lot à un autre	La synthèse chimique permet une production reproductible
Modification d'une manière aléatoire, n'est pas dirigée	Les modifications sont dirigées à des sites bien définis
Reconnaissance de cibles sous des conditions physiologiques ou proches	Les conditions peuvent être définies pour générer des aptamères actifs sous les conditions souhaitées
Sont sensibles à la température, leur dénaturation est irréversible	Sont stables face à la température, leur dénaturation est réversible
Une durée de vie limitée, la régénération peut entraîner une perte d'activité	Longue durée de vie, la régénération peut être effectuée sans affecter l'activité
Paramètres cinétiques non modifiables	Paramètres cinétiques modifiables
Haut poids moléculaire (~150 kDa)	Poids moléculaire faible (typiquement 25 kDa ou moins)

1.3.3 Les aptamères modifiés

La diversité chimique des aptamères est restreinte à cause de la limitation au niveau des bases azotées qu'ils forment, provoquant ainsi une diminution de spectre de cible. En effet l'intégration d'une modification dans la librairie d'oligonucléotides peut augmenter les interactions aptamère-cible et donc le spectre de ligand. Ces modifications peuvent être divisées en deux catégories.

Une première approche implique des réarrangements sur les modes de liaisons hydrogène (Benner, 2004) permettant d'augmenter le nombre des nucléosides de 4 à 12. Dans ce système d'information génétique artificiellement étendu (SIGAE), les 12 nucléosides s'apparient grâce à six modes de liaisons hydrogène différents (**Figure 1-8**).

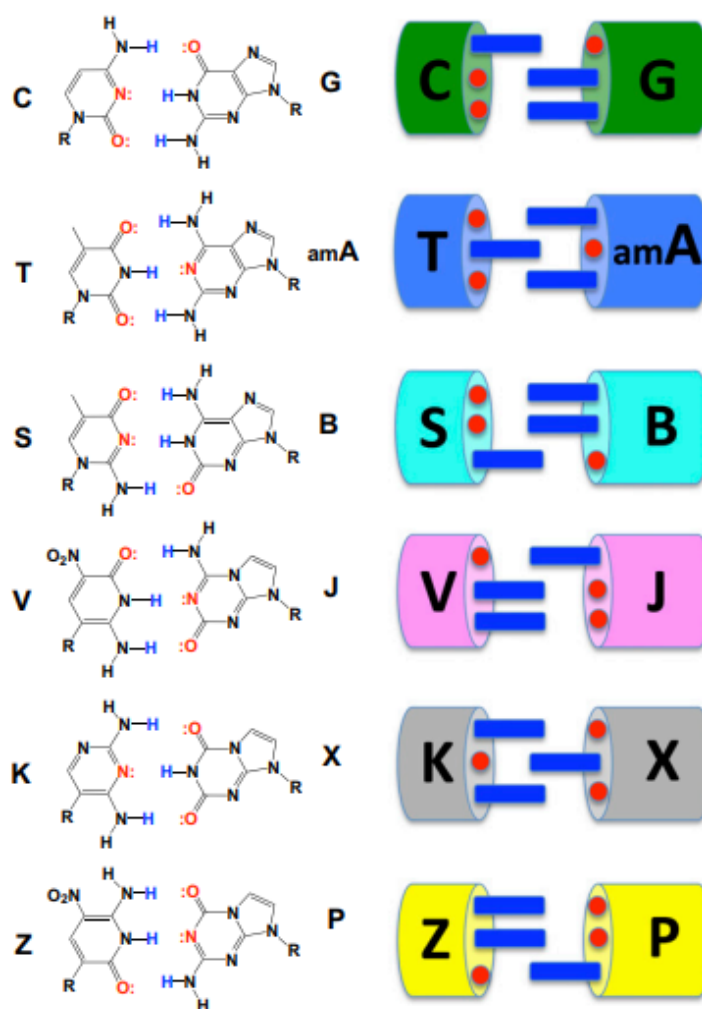


Figure 1-8 : Structure moléculaire de 12 nucléosides. Tiré de (Sefah *et al.*, 2014)

Code de couleur : **Rouge** : Les accepteurs de liaison hydrogène, **Bleu** : Les donneurs de liaison hydrogène

Dans cette optique, un aptamère SIGAE (ZAP2012) contre des cellules cancéreuses du sein a été identifié par le groupe de Tan (Sefah *et al.*, 2014). La séquence aptamérique contient six nucléosides (les quatre nucléosides standards A, C, G et T, et deux nucléosides artificiels P et Z). Ce dernier présente une constante de dissociation de l'ordre de nanomolaire. Cette affinité

est diminuée ou perdue lorsque les deux nucléosides Z et P sont remplacés par d'autres nucléosides standards.

D'autres études ont développé une paire de base non naturelle le d5SICS et le dNaM (**Figure 1-9**) portant des nucléobases hydrophobe (Malyshev *et al.*, 2014). Ces deux nucléotides sont efficacement amplifiés par PCR et transcrit *in vitro*.

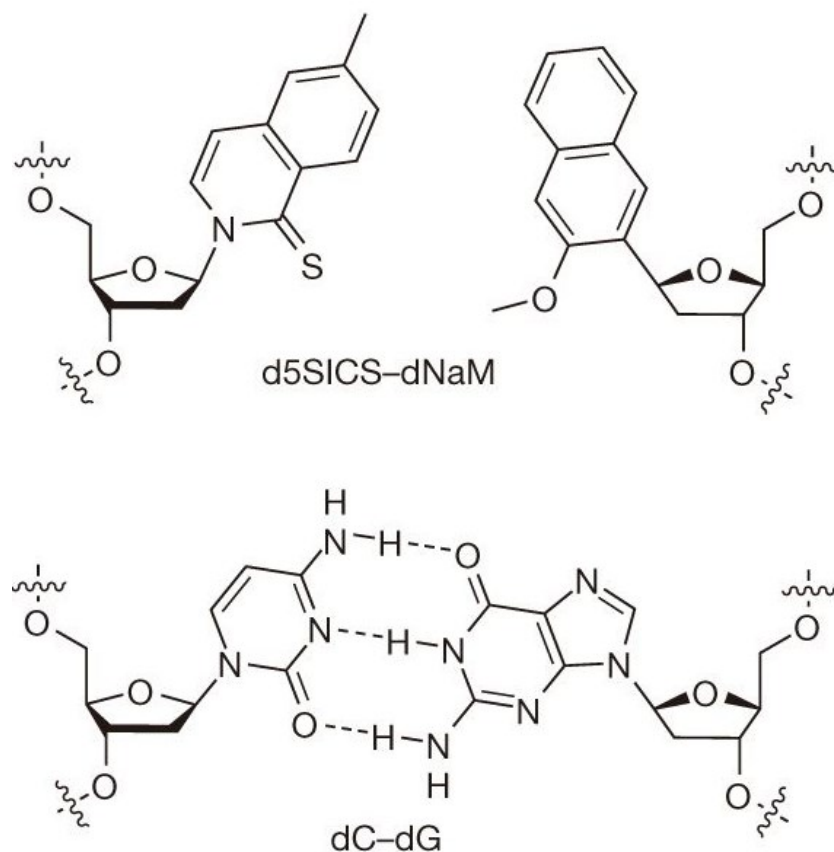


Figure 1-9 : Structure moléculaire de la paire non naturelle (d5SICS-dNaM) par rapport à la paire de bases naturelles (dG-dC).

Une deuxième approche implique l'utilisation d'un nucléotide modifié à la place d'un nucléotide standard. Des études récentes rapportent l'intégration d'un nucléotide modifié le 5-éthynyl-déoxyuridine (EdU) présentant un groupement éthynyle permettant de fixer une molécule spécifique par réaction de chimie click (Gawande *et al.*, 2017; Pfeiffer *et al.*, 2018).

La chimie click présente une méthode simple permettant de joindre des molécules dans des conditions douces et en présence d'une gamme variée de groupes fonctionnels. Le meilleur exemple de cette catégorie de réactions chimiques est la réaction de cycloaddition azide-alcyne (CuAAC) catalysée par le cuivre. Cette dernière présente un potentiel dans le domaine de

synthèse des oligonucléotides d'ADN chimiquement modifiés indispensables dans plusieurs applications biologiques (El-Sagheer & Brown, 2010) grâce aux caractéristiques suivantes :

- Les azides et les alcynes peuvent être fixés aux acides nucléiques sans perturber considérablement leurs propriétés biophysiques.
- Les azides et les alcynes ne réagissent généralement qu'entre eux.
- L'unité triazole formée est extrêmement stable et n'est pas toxique.

Le groupe de Pfeiffer a réussi à introduire plusieurs modifications en utilisant la réaction de CuACC pour modifier une librairie d'ADN pour sélectionner un aptamère contre le THC (Pfeiffer *et al.*, 2018).

1.3.4 Les applications des aptamères

- **Diagnostics**

Leur grande affinité et spécificité rend les aptamères des agents de diagnostic idéaux, ils sont notamment utilisés pour la reconnaissance d'agents pathogènes et de cellules cancéreuses, pour la surveillance de contaminations environnementales et comme marqueurs de souches.

- Reconnaissance de pathogènes

Un grand nombre d'aptamères ont été sélectionnés contre plusieurs pathogènes, voici quelques exemples. Des aptamères ont été sélectionnés contre des protéines extra-membranaires d'*E. coli* pour détecter la souche entérotoxigène K88 (Bruno *et al.*, 2010). De plus les stratégies de SELEX ont permis de générer des sondes moléculaires aptamériques contre le virus d'herpès simplex (Gopinath *et al.*, 2012), le virus de l'hépatite C (Fukuda *et al.*, 1997) et le virus de la grippe (Gopinath *et al.*, 2005).

- Reconnaissance des cellules cancéreuses

Pareillement, plusieurs aptamères ont été générés pour identifier différents types de cancer en ciblant des biomarqueurs de surface cellulaire (Ye *et al.*, 2015). De plus, des aptamères conjugués à des molécules fluorescentes ont montré un potentiel comme sondes en imagerie médicale pour la détection de tissus tumoraux métastatiques (Li *et al.*, 2015).

- Surveillance de la contamination de l'environnement

Les antibiotiques issus de la production animale, les métaux lourds et les toxines présentent un danger pour l'Homme et l'environnement. Pour surveiller cela, plusieurs aptamères ont été

sélectionnés contre des antibiotiques tels que la tétracycline (Kim *et al.*, 2010), le chloramphénicol (Burke *et al.*, 1997), aussi bien que pour des toxines comme l'ochratoxine A (OTA) (Cruz-Aguado & Penner, 2008) et contre des métaux tel que le mercure (Zeng *et al.*, 2017). En outre plusieurs aptamères ont été générés afin de détecter des herbicides et pesticides (Fan *et al.*, 2013; Sinha *et al.*, 2010).

- **Biosenseurs**

Un aptasenseur est un biocapteur dont l'élément de reconnaissance est un aptamère (Lim *et al.*, 2009). Le mode de détection se base sur un changement de signal lors d'une liaison avec la cible potentielle, généralement dû à un changement structural. Le signal le plus souvent utilisé est la fluorescence. Dans ce cas, l'aptamère est typiquement synthétisé avec un fluorophore et un *quencher* sur ses extrémités. Lorsque ces groupements aux deux extrémités sont éloignés, le fluorophore émet un signal fluorescent. Ce signal est perdu lorsque les extrémités sont proches. Cette perte de signal traduit la liaison de la cible à l'aptamère. La figure 1-10 montre un exemple de détection de la cocaïne grâce à un aptamère par une quantification du signal fluorescent. (Stojanovic *et al.*, 2001).

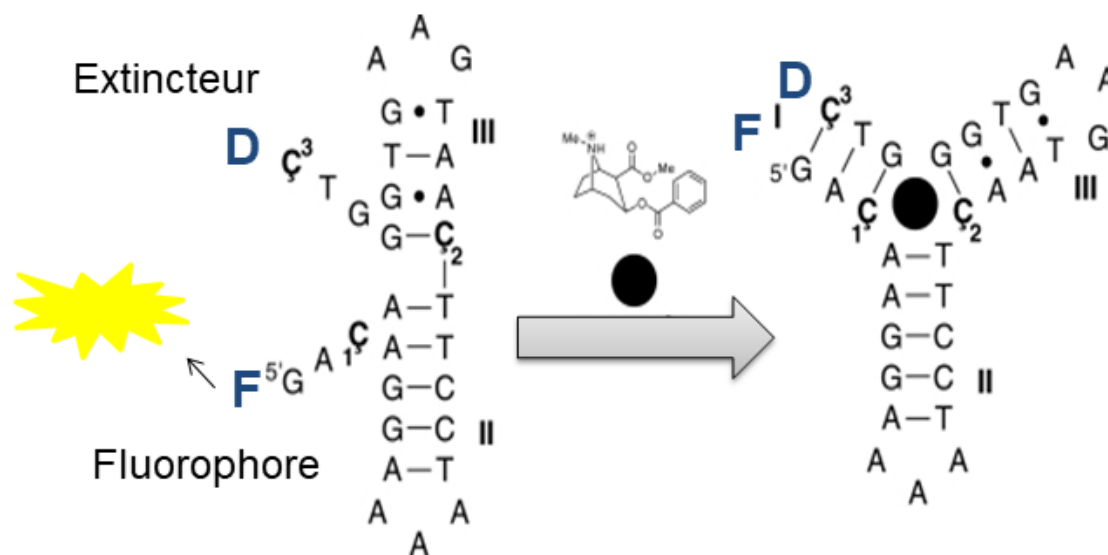


Figure 1-10 : Détection de la présence de la cocaïne par un changement de la conformation de l'aptamère.
Adapté de (Cekan *et al.*, 2009)

Les aptamères peuvent être aussi fixés sur un matériau comme un film d'or pour permettre d'évaluer l'interaction par la résonance plasmonique (SPR) (Song *et al.*, 2012). Ils peuvent aussi

être conjugués à des fibres optiques (Celebanska *et al.*, 2019)) ou des électrodes (Baker *et al.*, 2006) à titre d'exemples.

Grâce à leur synthèse facile et leur capacité à se lier spécifiquement, les aptasenseurs peuvent être utilisés dans plusieurs applications.

- **Applications thérapeutiques**

Les aptamères sont utilisés dans le domaine thérapeutique comme inhibiteurs ou activateurs de récepteurs, ou pour administrer des molécules thérapeutiques aux tissus cibles (**Tableau 1.4**) (Zhou & Rossi, 2017). Par exemple, des aptamères d'ARN contre le dérivé gp120 peuvent neutraliser le VIH-1 (Mufhandu *et al.*, 2012). En outre, le pegaptanib, un aptamère spécifique du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), présente un potentiel thérapeutique contre la dégénérescence maculaire, en inhibant le VEGF primordial dans l'angiogenèse pathologique.

Tableau 1-4 : Exemples d'aptamères utilisés pour l'administration de médicaments (Zhang *et al.*, 2019)

Cible	Aptamère	Cible à sélectionner	Mode d'administration
Récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR)	ARN	Domaine extracellulaire de l'EGFR	Nanoparticules
Chaîne lourde d'immunoglobuline (IgM)	ADN	La cellule	Micelle de nanoparticules
Antigène membranaire spécifique de prostate (PSMA)	ARN	Domaine extracellulaire purifié de PSMA	Administration de siRNA,
Protéine tyrosine kinase-7 (PTK7)	ADN	Cellule	Administration de chimiothérapeutiques

1.4 SELEX

1.4.1 Généralité sur le SELEX

Décrit pour la première fois en 1990 par les groupes de Gold et de Szostak (Ellington & Szostak, 1990; Tuerk & Gold, 1990), le SELEX, ou la sélection *in vitro*, est le processus de base utilisé pour isoler des aptamères fonctionnels pour une cible d'intérêt. En général, le processus SELEX comprend trois étapes qui sont répétées afin de rechercher les séquences les plus aptes à se lier à la cible.

Dans la première étape, une librairie aléatoire de départ de 10^{15} à 10^{16} oligonucléotides, ayant tous des séquences (Song *et al.*, 2008) uniques est incubée avec une molécule cible et les molécules non liées sont séparées des molécules liées. La deuxième étape consiste à séparer les oligonucléotides liés à la cible et laver les non liés. Enfin, les acides nucléiques élués, qui étaient liés à la cible, sont amplifiés par PCR et servent de librairie enrichie pour le prochain cycle. Pour chaque cible, une dizaine de cycles consécutifs (Tuerk & Gold, 1990) est effectuée et la librairie enrichie finale est clonée et séquencée. Un résumé du SELEX est présenté dans la figure 1-11.

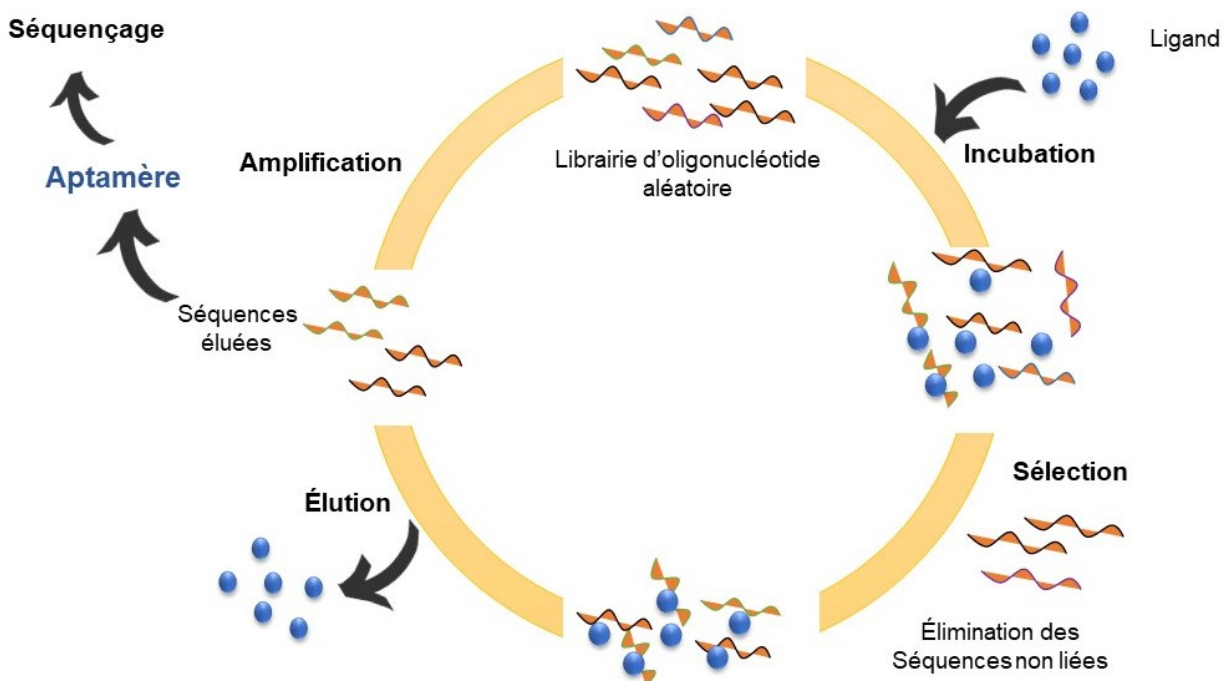


Figure 1-11 : Schéma du principe d'évolution systématique des ligands par procédé d'enrichissement Exponentiel (SELEX).

1.4.2 Les méthodes de SELEX

Dans la littérature, il existe plusieurs stratégies de SELEX dont les principales différences reposent sur la méthode de sélection.

- **Capture-SELEX**

Au cours du Capture-SELEX, la librairie est immobilisée sur un support solide au lieu de la cible permettant de générer des aptamères contre des petites molécules solubles. Les séquences de la librairie contiennent une région connue centrale flanquée de deux régions aléatoires (**Figure 1-12**). La région connue présente une séquence complémentaire à un oligonucléotide biotinylé qui permet son immobilisation sur des billes de streptavidine. Certains aptamères qui interagissent avec leur ligand sont capables de se détacher des billes via un changement de conformation, ce qui permet leur élution pour ensuite être amplifiés par PCR (Nutiu & Li, 2005). La méthode de Capture-SELEX a été utilisée pour sélectionner des aptamères d'ADN et d'ARN contre de petites molécules organiques solubles (Lauridsen *et al.*, 2018).

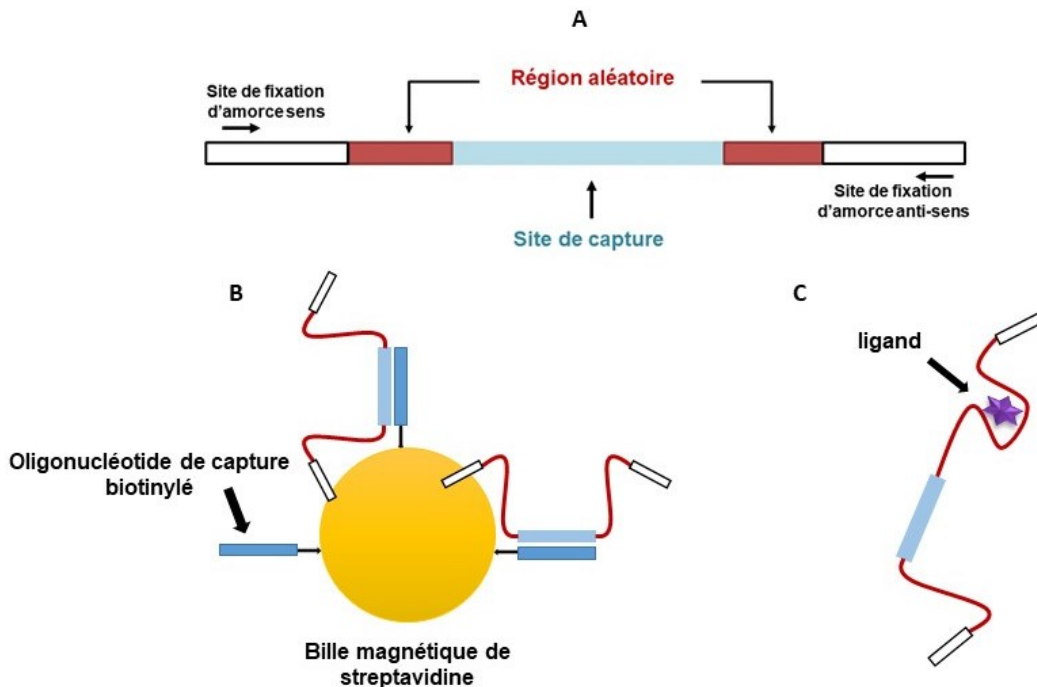


Figure 1-12 : Représentation schématique de la librairie utilisée en Capture-SELEX.

A : Conception de la librairie, **B** : Immobilisation des séquences de la librairie sur des billes magnétiques de streptavidine, **C** : Interaction de l'aptamère avec son ligand en se détachant des billes.

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

L'électrophorèse capillaire est une technique de séparation analytique des ions basée sur leur mobilité électrophorétique et leur charge (Mosing & Bowser, 2009). L'aptamère est sélectionné en séparant les molécules d'ADN liés à la cible de celles non liés dans une solution par un décalage de mobilité (**Figure 1-13**). Le CE-SELEX a été récemment utilisé avec succès pour sélectionner des aptamères contre le glypican-3, un biomarqueur tumoral pour le diagnostic précoce du carcinome hépatocellulaire (Dong *et al.*, 2018).

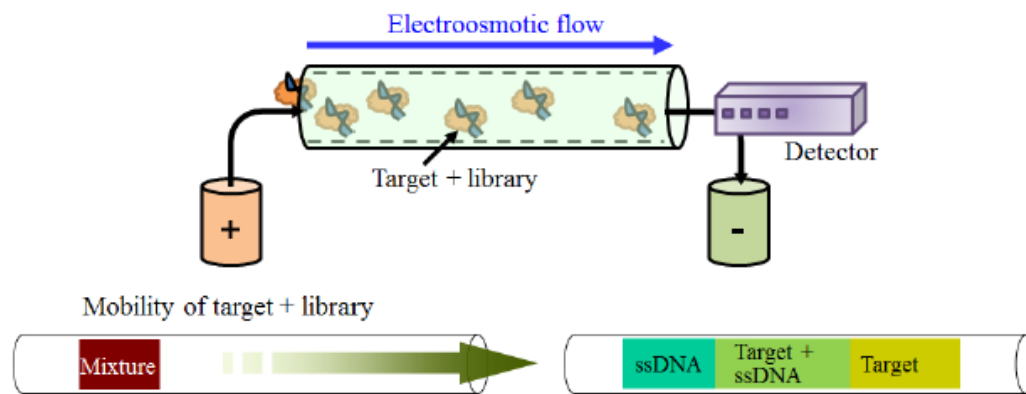


Figure 1-13 : Principe fondamental de sélection en utilisant CE-SELEX. Tiré de (Song *et al.*, 2012).

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

M-SELEX est une technique automatisable pour la génération rapide d'aptamères à haute affinité et spécificité à l'échelle microscopique basée sur un système microfluidique. Il existe deux manières d'immobilisation des molécules cibles pour réaliser le M-SELEX :

- Fixation des molécules cibles sur des micro-billes magnétiques (Cho *et al.*, 2010).
- Encapsulation des cibles dans du gel (Bae *et al.*, 2013).

Plusieurs aptamères ont été sélectionnés par M-SELEX, notamment pour la nucléoprotéine de la grippe A (InfA NP), pour des cellules de cancer de l'ovaire et pour des biomarqueurs cardiovasculaires (Ahmad *et al.*, 2011; Sinha *et al.*, 2018).

- **Microscopie à force atomique-SELEX (AFM-SELEX)**

AFM-SELEX utilise la microscopie à force atomique à haute résolution (AFM) pour créer des images tridimensionnelles de la surface de l'échantillon. Un aptamère a été récemment sélectionné par le groupe de Kondo (Takenaka *et al.*, 2017) en utilisant cette méthode contre l'albumine de sérum humain.

Le tableau 1-5 résume les avantages et les inconvénients de différentes méthodes utilisées au cours de SELEX.

Tableau 1-5: Principaux avantages et inconvénients de méthodes de SELEX couramment utilisées (Zhang *et al.*, 2019).

Méthodes	Avantages	Inconvénients
Capture-SELEX	Utile pour la sélection d'aptamères contre les petites molécules. Utilisé pour la découverte d'aptamères à changement de structure.	Certains oligonucléotides de la librairie pourraient ne pas être sélectionnés.
CE-SELEX	Rapide, juste (1 à 4) tours de sélection sont nécessaires. Réduit la liaison non-spécifique. Immobilisation de la cible non requise.	Équipement coûteux. N'est pas adéquat aux petites molécules.
M-SELEX	Rapide. Très efficace (nécessite de faibles quantités de réactifs). Adéquat pour les petites molécules. Automatique.	Le faible niveau d'enrichissement et la récupération des aptamères due à l'agrégation des billes dans le micro-canal.
AFM-SELEX	Capable de sélectionner des aptamères de haute affinité. Rapide (3-4 tours requis).	Équipement cher.

2 Problématiques, Hypothèses et Objectifs

Le trafic et la consommation de drogues présentent un impact négatif sur la santé et la sécurité publique aussi bien que sur l'économie du pays, notamment dû à l'addiction chez les jeunes, aux surdoses, aux accidents de la route et aux crimes associés à la drogue. Le code criminel canadien interdit la conduite avec des facultés affaiblies par les drogues malgré la légalisation de la consommation de cannabis à des fins non médicales en octobre 2018, d'où la nécessité d'utiliser des méthodes simples et performantes pour le dépistage d'une consommation récente afin d'exercer un contrôle lors de la conduite d'une part et la détection du trafic de drogue d'autre part. En parallèle, la détection d'une molécule volatile dérivée de drogue, comme le méthyl benzoate, paraît plus utile que la détection de la cocaïne elle-même en cas de trafic. Ceci peut faciliter la tâche pour la douane en réduisant le temps de contrôle pour chaque conteneur et en évitant la charge et la décharge des bagages.

Les techniques de détection existantes se basent généralement sur des principes immunologiques. Ces dernières utilisent des anticorps comme biocapteurs qui ne sont pas spécifiques à une molécule bien déterminée ce qui génère des résultats faussement positifs. Les aptasenseurs sont des biosenseurs dont la partie biocapteur est un aptamère permettant de lier d'une manière spécifique et avec une haute affinité une molécule cible. Ces derniers présentent des points forts par rapport aux anticorps.

Par contre, la diversité chimique des aptamères est restreinte à cause de la limitation au niveau des bases azotées qui les forment, affectant ainsi la possibilité de sélectionner des aptamères avec une grande affinité contre certains types de cible. Néanmoins, l'intégration d'une modification dans la librairie d'ADN peut augmenter les interactions aptamère-cible et donc le spectre de ligands.

En effet nous avons émis l'hypothèse que la modification d'ADN par ajout d'une molécule hydrophobe peut le rendre plus performant. Cet ajout favoriserait les interactions hydrophobes pour cibler des petites molécules hydrophobes dérivées de drogues comme le méthyl benzoate, le THC et le THC-COOH.

Pour répondre à nos hypothèses deux objectifs ont été fixés :

- 1. La sélection des aptamères contre le méthyl benzoate en utilisant des billes magnétiques azide** : En ayant recours à la sélection *in vitro* SELEX, des aptamères ont été générés, en utilisant deux librairies d'ADN aléatoire, une librairie classique et une autre modifiée. En effet, pour améliorer la liaison et l'affinité des aptamères avec les molécules hydrophobes cibles, nous modifions les librairies d'ADN par une réaction de chimie click en ajoutant une molécule hydrophobe (un dérivé du coumarin) afin de donner un caractère hydrophobe aux aptamères.

Les cycles d'enrichissement ont été optimisés et un test d'affinité par marquage radioactif a été réalisé pour évaluer l'évolution de l'affinité et de l'enrichissement de SELEX. Les molécules aptamériques ont par la suite été séquencées et les séquences potentielles caractérisées.

- 2. Validation d'une méthode de sélection le SR-PAGE** : nous testons la méthode en utilisant différentes constructions de riboswitch connus pour valider la méthode d'une part et déterminer des contrôles positifs permettant d'utiliser le SR-PAGE comme une étape de sélection dans le processus de SELEX afin d'identifier des aptamères contre les métabolites du cannabis et d'autre drogues.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Sélection des aptamères contre le méthyl benzoate

3.1.1 Conception de la librairie et d'amorces pour SELEX

Les aptamères ont été sélectionnés à partir d'une grande librairie d'oligonucléotides aléatoires. Afin de créer la librairie, 10^{16} séquences d'ADN potentiellement uniques ont été synthétisées par *Biocorp DNA* par randomisation mixte. Chaque séquence de la librairie est composée d'une région aléatoire d'une cinquantaine de nucléotides et de deux régions connues. Ces deux régions servent à l'amplification par PCR des séquences sélectionnées à chaque cycle.

Le modèle est le suivant :

- Librairie d'ADN avec nucléotide modifié : un nucléotide modifié, le 5-éthynyl-2-déoxyuridine 5'-triphosphate d'U*TP (*Jena Bioscience*) (**Figure 3.1**) a été incorporé dans la séquence à la place du nucléotide thymidine.

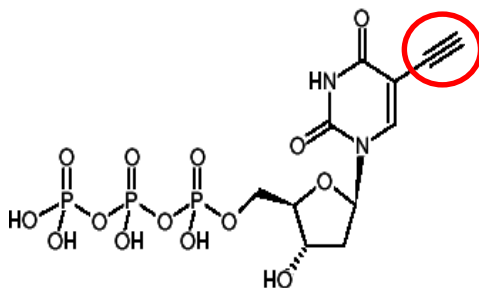


Figure 3-1: Structure du nucléotide modifié d'U*TP.

Tableau 3-1: Séquences utilisées au cours du SELEX pour la librairie modifiée.

Nom	Type	Séquence 5'-3'
BS088	Librairie	TGGCTCTGGCTTCCGTCC-N ₅₀ -CGAGAGAGCCGAAGCAGC
RR012 F	Amorce	TGGCTCTGGCTTCCGTCC
RR013 R	Amorce	A ₂₀ ZGCTGCTTCGGCTCTCTCG

Z : Termineur d'amplification PEG (Poly éthylène glycol), N=A, U*, C, G.

- Librairie d'ADN classique

Tableau 3-2: Séquences utilisées au cours du SELEX pour la librairie classique.

Nom	Type	Séquence 5'-3'
BS065	Librairie	AGACACAGGCTTCCATCC-N ₅₇ -CGTATAATAGCCTTGCCC
RR012 F	Amorce	AGACACAGGCTTCCATCC
RR013 R	Amorce	A ₂₀ ZGGGCAAGGCTATTATACG

Z : Termineur d'amplification PEG (Poly éthylène glycol), N=A, T, C, G.

3.1.2 Modification de la librairie modifiée par chimie click

Afin de donner un caractère hydrophobe à l'ADN, une réaction de chimie click a été réalisée en présence d'un catalyseur (le cuivre) (**Figure 3-2**), en mélangeant 25 µL de sodium ascorbate (100 mM) fraîchement préparé, 42 µL de tampon phosphate de potassium pH 7 (100 mM), 20 µL d'une solution de cuivre (réalisée à partir d'un mélange frais de 4 µL de CuSO₄ [20 mM] et 20 µL de THPTA [Tris-hydroxypropyltriazolylmethylamine] (Sigma Aldrich) [50 mM] avec une proportion 1:5), d'ADN modifié (biomolécule alkyle) (100 nmoles pour le premier tour et toutes les séquences sélectionnées après chaque tour) et 10 µL de molécules-azide 5 mM, le 7-(diéthylamino) coumarin-3-carbonyl azide (Sigma Aldrich). Après une heure d'incubation à température ambiante avec une rotation douce, une migration a été réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (décrit dans la section 3.1.6) pour purifier l'ADN. Afin de s'assurer de la modification, une réaction de chimie click a été réalisée avec de l'ADN marqué avec le ³²P.

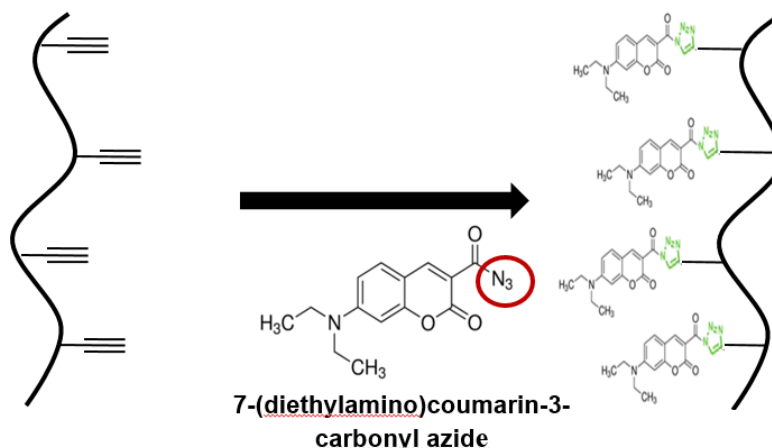


Figure 3-2: La conjugaison entre la molécule hydrophobe et l'ADN modifié.

3.1.3 Immobilisation de molécules de méthyl 4-éthynylbenzoate sur des billes azides magnétiques

La première étape de sélection consiste à l'immobilisation du ligand méthyl 4-éthynylbenzoate sur des billes azide magnétiques par une autre réaction de chimie click (**Figure 3-3**). Cette molécule possède une structure chimique similaire au méthyl benzoate en l'exception de l'ajout d'un groupement éthyne en position 4 interagissant avec le groupement azide des billes. Le principe de la méthode est le même que celui décrit dans la section précédente. Une incubation pendant une heure à température ambiante a été réalisée, ensuite le tube a été placé dans un support magnétique de telle sorte que les billes sont immobilisées sur la paroi du tube, le surnageant a été récupéré, après deux lavages ont été effectués afin d'éliminer tout excès du méthyl 4-éthynylbenzoate par le tampon de SELEX (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ et 10 mM HEPES).

Afin de s'assurer de la fixation de méthyl 4-éthynylbenzoate sur les billes. Une courbe d'étalonnage a été établie par la mesure de l'absorbance de plusieurs concentrations de méthyl 4-éthynylbenzoate à 259 nm à l'aide d'un Nanodrop. Le nombre de moles de méthyl 4-éthynylbenzoate fixées sur les billes a été calculé en soustrayant les moles existant dans le surnageant et les deux lavages.

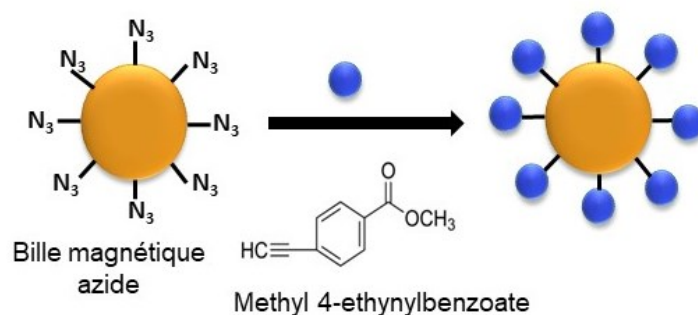


Figure 3-3: Représentation schématique de la réaction de chimie click entre les billes et le Méthyl 4-éthynylbenzoate.

3.1.4 Processus de la sélection *in vitro*

Au cours de chaque cycle de SELEX (**Figure 3.4**), l'ADN est incubé avec le méthyl 4-éthynylbenzoate immobilisé sur des billes magnétiques dans le tampon de SELEX pendant une heure ou 30 min à température ambiante sous une agitation douce, les billes ont été doucement séparées par un séparateur magnétique pendant 5 min. Après, deux lavages ont été effectués pendant 30 min en ajoutant 400 μL du tampon de SELEX. Les séquences d'ADN liées sont amplifiées par PCR avec des amorces inégales (décrit dans la section 3.1.5) suivi d'une séparation sur un gel de polyacrylamide (décrit dans la section 3.1.6) pour être utilisé dans le cycle suivant. Une réaction de chimie click avec le 7-(diéthylamino) coumarin-3-carbonyl azide a été réalisée pour les séquences d'ADN modifié avant de commencer le cycle prochain.

- Tour 1 :

Une quantité de 100 nmoles d'ADN (classique et modifié par chimie click décrit dans la section 3.1.2), c'est-à-dire environ 10^{16} séquences, a été incubée avec ~ 5 pmoles de méthyl 4-éthynylbenzoate fixé aux billes. Après la sélection, les séquences d'ADN liées aux billes ont été resuspendues dans 15 μL d'eau. Par la suite, une amplification d'un volume final de 1.5 ml a été réalisée (en mettant 1 μL des séquences immobilisées sur les billes dans chaque réaction de PCR de 100 μL). La purification de produit de PCR (décrit dans la section 3.1.6) a été faite sur deux gels comportant chacun quatre puits de 400 μL de volume.

Le rapport (ADN : ligand) a été modifié au cours du processus ainsi que le temps d'incubation afin d'augmenter la rigueur du SELEX. En effet, en changeant certains paramètres on tente de favoriser la sélection des aptamères présentant plus d'affinité et de spécificité. De plus, des sélections négatives ont été réalisées pour éliminer toutes les séquences présentant une affinité contre les billes magnétiques. À cette fin, l'hexyl-1-ol a été immobilisé sur les billes en utilisant le

même protocole que la section 3.1.3. Les sous-librairies ont été incubées pendant 30 min avec des billes conjuguées à l'hexyl-1-ol et 400 µL du tampon de SELEX. Ensuite, les billes ont été séparées en utilisant le support magnétique. Le surnageant récupéré a été incubé par la suite avec des billes immobilisant le méthyl 4-éthynylbenzoate.

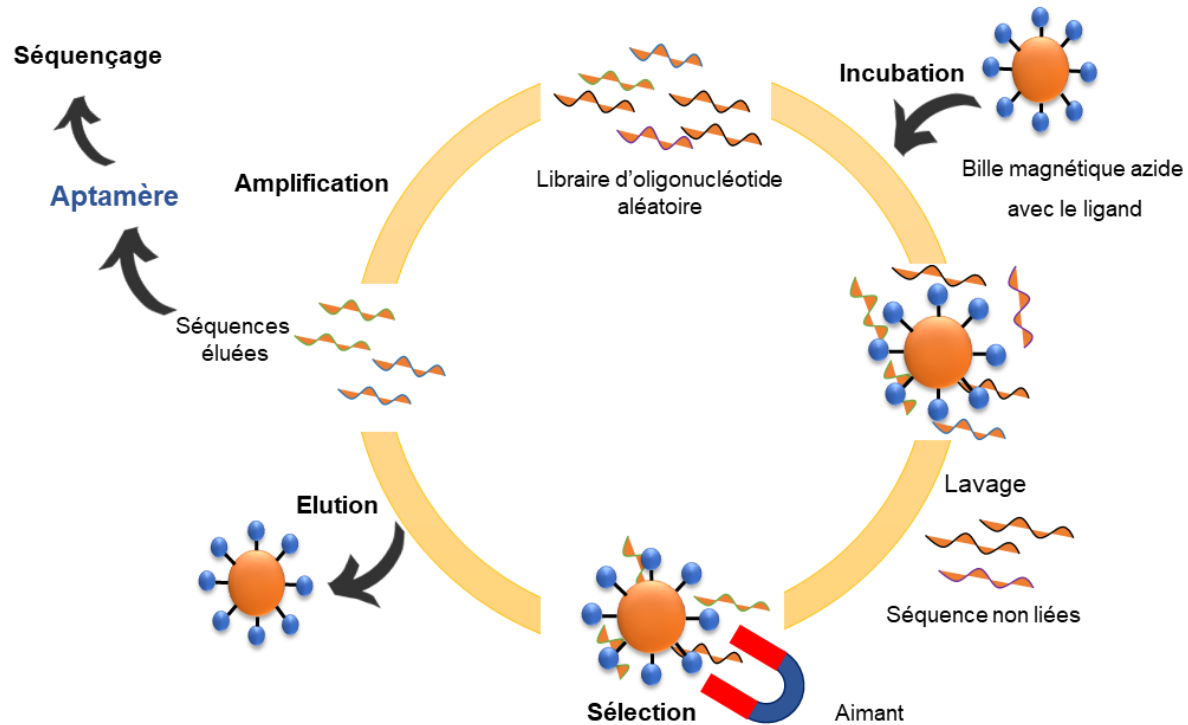


Figure 3-4: Représentation schématique de processus de sélection in vitro SELEX

La librairie d'ADN aléatoire est incubée avec la cible spécifique. Les séquences d'ADN non liées sont éliminées dans les lavages et les autres liées sont éluées et amplifiées pour être utilisées lors du prochain cycle.

Les tableaux ci-dessous résument les quantités d'ADN et le temps d'incubation utilisés dans chaque cycle.

Tableau 3-3: Résumé des tours de SELEX de l'ADN modifié.

Tour	Temps d'incubation (min)	Sélection négative	ADN (pmol)	Méthyl 4-ethynylbenzoate (pmol)	Ratio ADN : MB
1	60	-	10 ⁵	5	20000 :1
2	60	-	15	5	3 :1
3	60	+	10	5	2 :1
4	60	-	10	5	2 :1
5	60	+	10	5	2 :1
6	30	+	10	5	2 :1
7	30	+	10	5	2 :1
8	30	+	10	5	2 :1
9	30	+	10	5	2 :1
10	30	+	10	5	2 :1

MB : Méthyl 4-ethynylbenzoate

Tableau 3-4: Résumé des tours de SELEX de l'ADN classique.

Tour	Temps d'incubation (min)	Sélection négative	ADN (pmol)	Méthyl 4-ethynylbenzoate (pmol)	Ratio ADN : MB
1	60	-	10 ⁵	5	20000 :1
2	60	-	25	5	5 :1
3	60	-	10	5	2 :1
4	60	+	10	5	2 :1
5	60	-	10	5	2 :1
6	60	-	10	5	2 :1
7	60	+	10	5	2 :1
8	60	-	10	5	2 :1
9	60	+	10	5	2 :1
10	60	+	10	5	2 :1
11	60	+	10	5	2 :1
12	30	+	10	5	2 :1
13	30	+	10	5	2 :1
14	30	+	10	5	2 :1
15	30	+	10	5	2 :1

MB : Méthyl 4-ethynylbenzoate

3.1.5 Amplification avec des amorces inégales

Au cours des tours de sélection, les séquences d'ADN simple brin sont obtenues par une amplification avec des amorces de tailles différentes, l'amorce anti-sens contient un terminateur (PEG) et une queue poly-A₂₀ (Figure 3-5).

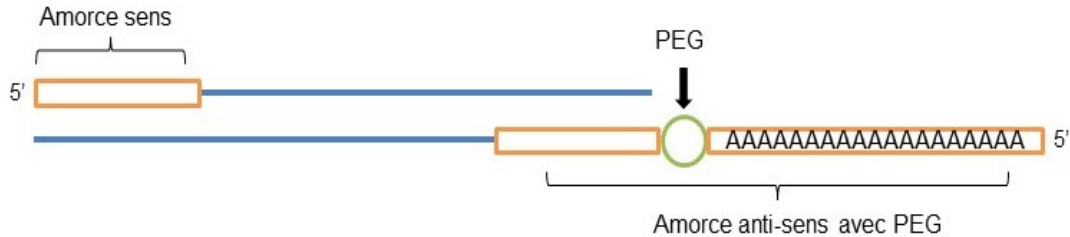


Figure 3-5: Principe de PCR avec amorces de longueur inégale.

À l'exception du premier tour, une réaction de 100 µL de PCR comporte toutes les séquences d'ADN attachées aux billes (moins de 5 pmoles), 1 µL de 2 µM de chaque amorce, 1 U de l'enzyme HotStart Plus Taq, 1x de tampon de PCR 10 X de la compagnie Qiagen, 0,2 mM de dNTP (on utilise du dU*TP à la place de dTTP pour la librairie modifiée) et le volume est complété avec de l'eau stérile. Le programme utilisé au cours de l'amplification est décrit dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3-5: Programme de la réaction de PCR.

Phases	ADN modifié	ADN classique	
Dénaturation initiale	(95°C, 15min)	(95°C, 15min)	
Dénaturation	(95°C, 30 sec)	(95°C, 30 sec)	} 25 cycles
Hybridation	(55°C, 30 sec)	(50°C, 30 sec)	
Elongation	(72°C, 30 sec)	(72°C, 30 sec)	
Elongation finale	(72°C, 5 min)	(72°C, 5 min)	

Après la réaction d'amplification, les deux brins d'ADN de tailles différentes présentent une vitesse de migration différente lors d'une séparation dans un PAGE dénaturant 6%.

3.1.6 Purification sur un gel de polyacrylamide dénaturant

Une migration sur un gel polyacrylamide dénaturant a été effectuée. Pour des molécules entre 20 et 100 nucléotides, un gel de 6% a été préparé, 12 ml d'acrylamide 20% (avec un ratio 19 :1 acrylamide : bisacrylamide) et 28 ml d'une solution de 8 M urée, TBE 1X [90 mM Tris, 90 mM acide borique, 2 mM EDTA, pH 8], à laquelle ont été ajoutés les catalyseurs de polymérisation 16 µL de TEtra Méthyl Ethylène Diamine (TEMED) et 320 µL d'ammonium PerSulfate (APS) 10%. Les échantillons ont été préparés avec un ratio 1 :1 v/v de tampon de charge 2X (0.05% bleu de bromophénol, 0.05% bleu de xylènecyanol, 10 mM EDTA dans du formamide). La migration a été faite dans un tampon TBE 1X pendant 1h à 500 volts.

Après la migration, le gel est mis dans 50 ml de TBE 1X avec 5 µL de GelRed 1000X sous agitation douce pendant 15 min. Le GelRed est un agent intercalant qui émet une fluorescence lorsqu'il s'intercale entre les nucléotides et lorsqu'il est exposé à une source de rayons ultraviolets. Les bandes ont été coupées, éluées dans 400 µL du tampon d'éluion (EDTA 0,1mM, NaCl 0,3 M, SDS 0,001%) pendant une heure à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. L'éluat obtenu a été précipité en ajoutant 0,1 v d'acétate de sodium (NaOAc) (3 M, pH 5,2) et 2,2 v d'éthanol 100%, laissé 30 min à -80°C ou 2h à -20°C suivie d'une centrifugation à 14 000 rpm pendant 30 min. Le surnageant est jeté et le culot est lavé avec 300 µL d'éthanol 70%, suivi d'une deuxième centrifugation pendant 10 min à 14 000 rpm. Le culot a été séché à l'air pendant 30 min. Finalement le culot a été suspendu dans l'eau stérile afin d'être utilisés dans le prochain cycle.

3.1.7 Test d'affinité des générations

Après avoir fini les cycles de sélection un test d'affinité par marquage radioactif a été réalisé pour évaluer l'enrichissement et l'affinité des générations de SELEX.

- **Marquage radioactif des aptamères avec ³²P**

Afin d'évaluer l'affinité des aptamères au cours du processus de SELEX, un marquage radioactif a été fait pour détecter la liaison. Les oligonucléotides des générations G₀, G₉, G₁₃ et G₁₇ de l'ADN classique, ainsi que G₃ et G₉ de l'ADN modifié, ont été incubés pendant une heure à 37°C en présence de 1 U/µL de la T4 polynucléotide kinase (T4 PNK) (NEB), de tampon PNK 1X (NEB), 0,1 µL d'ATP[γ³²P] et le volume final a été ajusté à 10 µL. Les oligonucléotides ont été ensuite purifiés sur un PAGE dénaturant 6% après l'ajout de 10 µL du tampon de charge 2X. Après la séparation, les bandes ont été visualisées par révélation sur une plaque phosphore (*storage*

phosphor screen, Molecular Dynamics) pendant une heure, puis un scann au Typhoon FLA 9500 (GE healthcare Life Sciences). L'image obtenue est imprimée à la taille réelle du gel et sert de plan pour localiser les bandes radiomarquées correspondantes aux ADN d'intérêt. Les bandes ont été coupées puis les séquences radiomarquées ont été éluées et précipitées à l'éthanol pour être utilisées dans le reste de l'expérience.

- **Protocole de quantification de l'affinité des générations**

Pour le test d'affinité, 10 µL de chaque solution d'aptamère marqué ont été incubés dans 100 µL de tampon de SELEX et 5 pmoles de ligand immobilisé sur les billes magnétiques pendant une heure à température ambiante sous agitation douce. Le surnageant a été récupéré à l'aide d'un support magnétique et deux lavages ont été appliqués avec le tampon de SELEX. Un volume de 50 µL de surnageant, de deux lavages et des oligonucléotides collés aux billes ont été déposés sur un papier Whatman. Le papier a été séché et enveloppé dans deux couches de papier cellophane, pour ensuite être exposé pendant 4 h dans une plaque au phosphore avant d'être scannée au Typhoon. La quantification d'aptamère liés et non liés se base sur la quantification de l'intensité de radioactivité dans chaque spot par rapport au total en utilisant le logiciel *ImageQuant*.

3.1.8 Séquençage à haut débit

Afin d'identifier les séquences potentielles d'aptamères, un séquençage à haut débit illumina MiSeq des générations 0, 3, 6, 9 et 11 d'ADN modifié et des générations 0, 3, 9, 12 et 15 d'ADN classique a été réalisé en envoyant 10 µL de produit de PCR au *Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill*. Nous avons utilisé un service *spike sequencing* permettant d'évaluer des milliers de séquences par échantillon.

Les résultats de séquençage ont été analysés par la suite par un programme dédié au SELEX, Aptasuite (Hoinka *et al.*, 2018), permettant d'aligner les différentes séquences et de déterminer leurs abondances dans chaque génération. Les données entrantes sont les différents fichiers de séquençage de chaque génération sous forme Fastaq.gz et les séquences de régions connues (l'amorce sens et le complémentaire de l'amorce anti-sens). Un fichier contenant les résultats d'analyse est généré en quelques minutes.

3.1.9 Séquençage Sanger

Afin de déterminer les séquences d'aptamères potentiels, un séquençage Sanger a été réalisé pour quelques vecteurs contenant les séquences de la dernière génération de SELEX de chaque librairie. Contrairement au séquençage à haut-débit, le séquençage Sanger permet de déterminer la séquence de clones isolés.

- **Ligation des vecteurs Easy pGEM®-T et de l'insert**

Pour réaliser le clonage, une ligation des séquences d'aptamères a été réalisée dans le plasmide pGEM®-T (Promega) (**Figure 3-6**). La réaction contient 5 µL de tampon de ligation 2X, 2 µL de produit de PCR de chaque génération de SELEX, 1 µL du vecteur et 1 µL de l'enzyme T4 DNA ligase pour un volume final de 10 µL ajusté avec l'eau stérile. Un contrôle positif, une ligation entre le plasmide et un insert, un fragment de 542 pb (pGEM®-luc Vector DNA), a aussi été faite. Le mélange a été incubé pendant 1 h à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

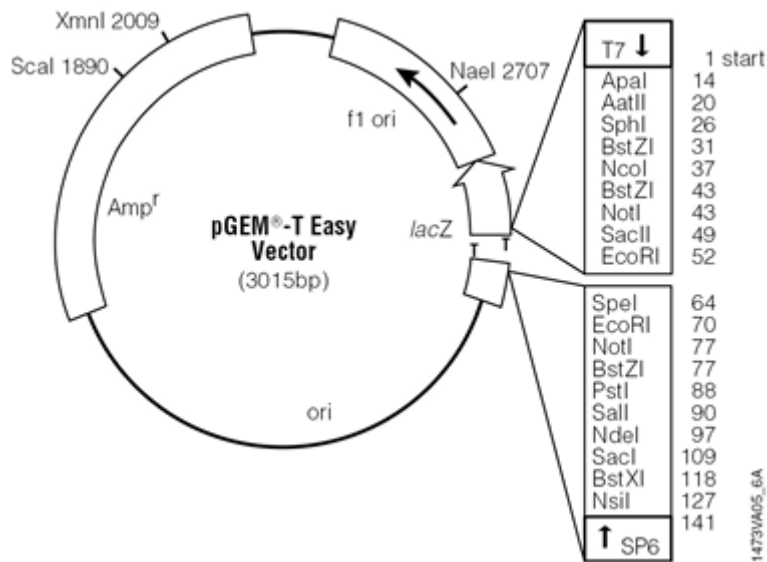


Figure 3-6: Le plasmide pGEM®-T utilisé pour le clonage des inserts. Tiré de (Promega, 2018)

- **Transformation des bactéries**

Les deux dernières générations de SELEX ont été clonées et un vecteur sans insert a été utilisé comme contrôle. 50 µL de cellules compétentes de *E. coli* DHα5 et 5 µL de produit de ligation ont été incubés pendant 30 min sur glace, puis suivi d'un choc thermique de 45 s à 42°C a été réalisé, avant de ré-incuber les tubes dans la glace pour 5 min. Enfin, une dernière incubation à 37 °C pendant une heure a été réalisée en ajoutant 1 ml de milieu de culture liquide Super Optimal Broth (SOC) (2% tryptone, 0,5% d'extrait de levure, 10 mM de NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ et 20 mM de glucose). Après avoir préparé des boîtes de Petri de LB agar en ajoutant

l'antibiotique (ampicilline 0,1 mg /ml) de l'IPTG (1 mM final) et de X-GAL (0,02 mg/ml final). Les souches ont été étalées sur gélose et incubées à 37°C entre 16 et 24 h.

Le lendemain, 10 colonies blanches de chaque génération ont été piquées et une PCR a été réalisée afin de vérifier la présence d'insert, puis ensemencées dans le LB liquide en présence de l'ampicilline et incubées toute la nuit à 37°C.

- **Extraction de plasmides**

Après une culture toute la nuit pour chaque clone, une extraction des plasmides transformés dans les cellules d'*E. coli* a été réalisée en utilisant un kit commercial *Presto™ Mini Plasmid kit* tel que décrit dans leur manuel. La première étape consiste à une lyse cellulaire suivie d'une neutralisation, des lavages et finalement une élution.

- **Séquençage Sanger**

Afin de connaître la séquence de chaque insert un séquençage Sanger a été fait en utilisant deux amorces T7 et SP6 pour avoir une lecture dans les deux sens (**Tableau 3.6**). Pour ce faire 10 µL de chaque plasmide ont été envoyés au *Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill*.

Tableau 3-6: Séquences des amorces utilisées lors du séquençage Sanger.

Amorces	Séquence 5'-3'
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG

3.1.10 Analyses bio-informatiques

Pour identifier les séquences aptamériques, un alignement à l'aide du logiciel Clustal omega a été réalisé entre la séquence d'aptamère de référence, la lecture sens avec l'amorce T7 et la lecture anti-sens avec l'amorce SP6 sous forme *FASTA*.

Après avoir obtenu les séquences d'aptamères potentielles (Apt 1 et Apt 2), la structure secondaire a été prédite à l'aide d'un logiciel en ligne *mFold* et une analyse par le programme G4-Hunter (Brázda *et al.*, 2019) a été faite pour la prédiction des structures G-quadruplex .

3.1.11 Détermination de la constante de dissociation K_d de deux clones

Les deux séquences d'aptamères identifiées par séquençage Sanger ont été amplifiées par PCR dans les mêmes conditions de PCR de SELEX en utilisant une amorce sens marquée avec un fluorophore Cy5. Une migration sur un PAGE dénaturant a été faite pour avoir des séquences d'ADNs. Puisque Apt2 présente un nucléotide modifié, une réaction de chimie click avec le 7-(diethylamino) coumarin-3-carbonyl azide a été réalisé.

Une concentration de 5 nM de deux aptamères a été incubée avec plusieurs concentrations de méthyl benzoate 75 nM à 5 mM avec une dilution en série par un facteur de deux. L'appareil Monolith NT.115 Pico (NanoTemper technologies) a été utilisé pour mesurer l'intensité de fluorescence en incubant 10 μ L d'aptamère avec 10 μ L de méthyl benzoate. Le mélange a été transféré dans des capillaires fins (NT.115 Standard Treated Capillaries). Une mesure de fluorescence de fluorophore Cy5 a été faite par la suite. Finalement un rapport d'analyse contenant les courbes de saturation ainsi que les valeurs de K_d ont été générées par l'appareil.

3.2 SR-PAGE une nouvelle méthode de sélection

Cette partie du mémoire a été réalisée en collaboration avec deux collègues de laboratoire Aurélie Devinck et Émilie Boutet. Nous avons ici pour but de mettre au point une méthode pour permettre une sélection d'aptamères pour de petites molécules sans nécessité d'immobiliser celles-ci sur des supports solides comme nous l'avons fait pour le méthyl benzoate.

3.2.1 Principe et méthodologie

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est une technique utilisée pour séparer les oligonucléotides en se basant sur leur mobilité électrophorétique. Cette mobilité varie en fonction de leur taille, de leur structure et de leur charge, ou simplement en fonction de leur taille et leur charge dans le cas de gels dénaturants.

Le SR-PAGE (*Shifted Reverse-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) est une méthode développée au sein du laboratoire de Jonathan Perreault, afin d'être intégrée dans le processus de SELEX, le principe de la technique est basé sur le changement de la conformation des oligonucléotides en présence et absence de leur ligand, ce qui provoque un changement de leur vitesse de migration dans un gel de polyacrylamide natif (**Figure 3-7**).

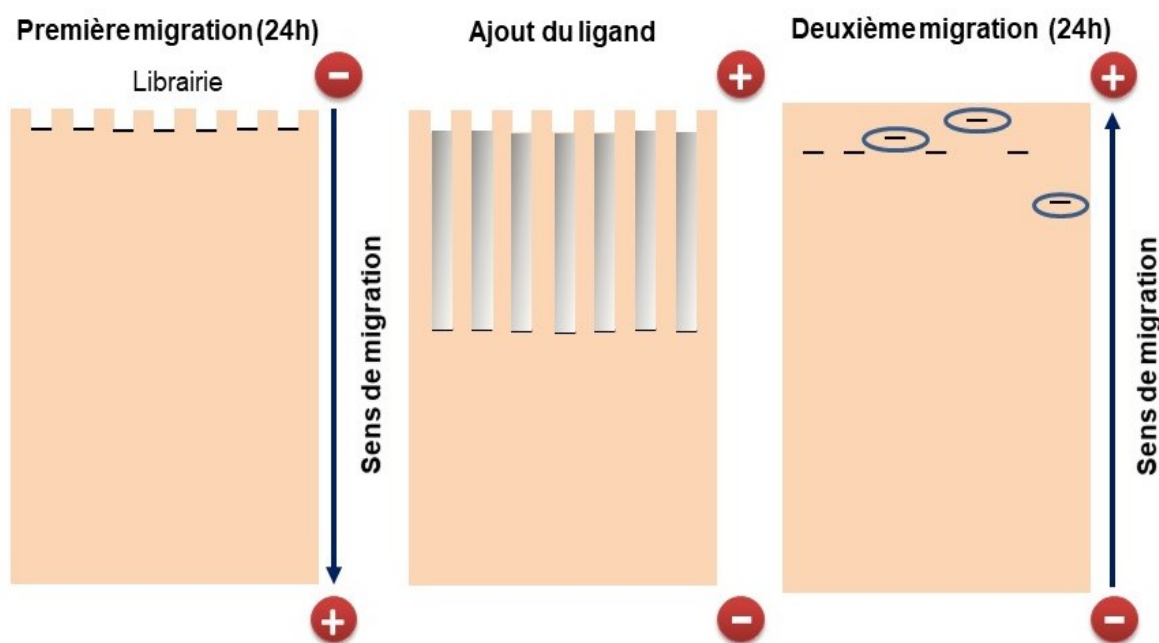


Figure 3-7: Représentation schématique de SR-PAGE (Shifted Reverse-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

Les bibliothèques d'oligonucléotides déposées dans le puits migrent vers le bas pendant 24h. Ensuite, le ligand est pulvérisé sur le gel jusqu'à saturation. Finalement, les oligonucléotides rebroussement chemin en inversant la polarité du gel.

Un gel de polyacrylamide 10% a été fait sans urée, afin 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. Juste 150 ml de mélange a été utilisé, auquel 70 µL de TEMED et 2 mL d'APS 10% ont été ajoutés, le reste a été gardé à 4°C pour la suite des manipulations.

Le gel est monté d'une manière permettant d'avoir un décalage de 2 cm entre les deux vitres. Après avoir coulé et polymérisé le gel, le dispositif a été maintenu à 4°C afin d'éviter l'échauffement du gel, pouvant provoquer la dénaturation des oligonucléotides, et une pré-migration (sans les échantillons) sous tension a été faite toute la nuit.

Le lendemain, les échantillons d'ARN marqués et un oligonucléotide fluorescent (un marqueur de migration) (**Tableau 3.7**), ont été déposés dans les puits du gel et une première migration à voltage constant de 500 V pendant 24h a été réalisée dans le tampon de migration TBMg 1X avec une re-circulation du tampon grâce à une pompe péristaltique.

Tableau 3-7: Préparation des échantillons de SR-PAGE

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

Tampon de charge : bleu de migration natif 6X (40% de sucrose, 0,05% bleu de bromophénol et 0,05% bleu de xylène cyanol).

Après avoir fini la première migration le dispositif a été démonté. Les puits ont été coupés puis une solution qui contient les ligands d'intérêt a été pulvérisée de façon à couvrir tout le gel sur le gel (**Tableau3-8**). Après 10 min, pour permettre au ligand de diffuser dans le gel, le montage est remonté et 70 µL de TEMED a été coulé sur l'extrémité des puits coupés. Ensuite la petite vitre a été remise en enlevant l'espace en bas du gel. Le reste du gel a été utilisé pour combler l'espace en haut des puits en lui ajoutant le ligand à une concentration 10 fois moindre que celle aspergée.

Tableau 3-8: Concentrations des ligands pulvérisés sur le gel.

Ligand	Concentration pulvérisée
Fluorure de potassium	6 mM
Flavine Mononucléotide (FMN)	5 μ M
Di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP)	3 μ M
Glycine	10 mM
Thiamine Pyrophosphate (TPP)	3 μ M
Chlorure de Nickel	3 mM
Chlorure de Cobalt	3 mM

Une fois le gel polymérisé, la migration est redémarrée, mais en inversant la polarité. Les ARN rebrousseront chemin et migreront en sens inverse. La deuxième migration a été faite pendant 24 h, soit le même temps que la première migration au même voltage (500 V).

Donc, si le ligand potentiel n'a eu aucun impact sur l'ARN, il devrait migrer de la même façon que lors de la première migration et revenir au point de départ. Par contre, si le ligand interagit avec l'ARN, cela devrait interférer avec sa migration dans le gel. Par exemple, si l'ARN forme une pochette de liaison autour du ligand rendant la structure plus compacte, cela pourrait lui conférer un avantage de vitesse.

Après la dernière migration le gel a été séché pendant 1 h sous vide et exposé toute la nuit sur une plaque phosphore, puis scanné au Typhoon.

3.2.2 Synthèse in vitro de l'ADN matrice du riboswitch glycine par PCR d'assemblage

Afin de produire la séquence d'ARN correspond au riboswitch glycine, une PCR d'assemblage (**Figure 3-8**) a été faite. Le tableau 3.9 résume les séquences d'oligonucléotides (Sigma Aldrich) utilisées pour la synthèse de matrice ADN. Un promoteur T7 a été ajouté à l'amorce sens afin de pouvoir transcrire l'ARN.

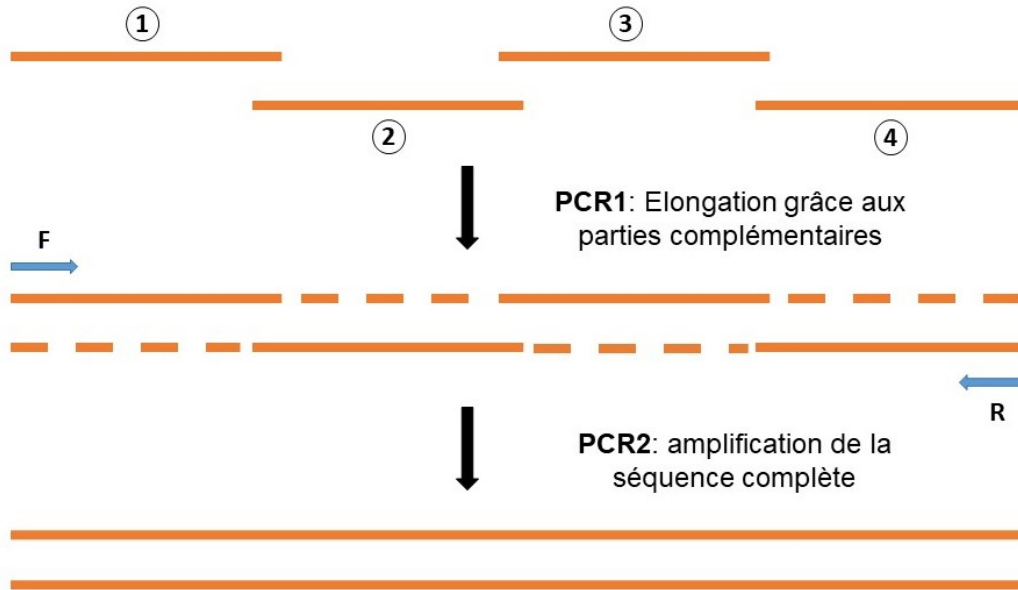


Figure 3-8: Principe de PCR d'assemblage.

La première étape consiste à assembler les différents fragments d'ADN. Après, une amplification ordinaire à l'aide de deux amorces aura lieu.

La PCR d'assemblage a pour but la synthèse *in vitro* d'une séquence nucléotidique de taille supérieure à 100 bases (non-disponible pour la plupart des oligonucléotides standards). Elle a été exécutée en deux étapes :

- Première étape : l'assemblage des séquences deux par deux (1-2 et 3-4) grâce aux régions complémentaires

La réaction comporte 1 μ M. de chaque oligonucléotide, 1 U de l'enzyme HotStart Plus Taq, 1x de tampon de PCR 10 X de la compagnie Qiagen, 0,2 mM de dNTP et le volume est complété avec de l'eau stérile. Le programme utilisé pour l'amplification présente une première phase de dénaturation (15 min, 95°C), et pour les cycles : une deuxième (1 min, 95°C), une phase d'hybridation (30 secondes, avec un gradient de température entre 55°C et 65°C pour les fragments 1-2 et entre 65°C et 72°C pour les fragments 3-4) et une phase d'élongation (30 sec à 72°C). Le cycle est répété 25 fois et est suivi par une phase d'élongation finale (5 minutes à 72°C).

- Deuxième étape : l'amplification complète de la séquence d'intérêt en utilisant les deux amorces **F** et **R**

Une réaction de 100 μ L a été réalisée en utilisant 10 μ L de produit de la première PCR et 2 μ M de chaque amorce. Le même programme a été utilisé pour la deuxième amplification en

changeant le gradient de température de phase d'hybridation entre 55°C et 65°C. Les tailles des amplicons ont été vérifiées en migrant sur un gel agarose 2%.

Tableau 3-9: Séquences utilisées pour la synthèse de l'ADN matrice du riboswitch glycine

Nom	Séquence (5'-3')
RR009Gly2.1	TAATACGACTATAGGGTTGAAGACTGCAGGAGAGTGGTTGTAA CCAGATTTTAA CATCTGAGCCAAATAACCCG
RR009Gly2.2	TCGCTTATTCGTTGCCAA TATATGGCTAAGAATAATGCACCTGAAAG ATTTACTTCTTCGG CGGGTTATTTGGCTCAGATG
RR009Gly2.3	TTGGCAACGAATAAGCGA GGACTGTAGTTGGAGGAACCTCTGGAGA GAACCGTTTA ATCGGTCGCCGAAGGAGCAAG
RR009Gly2.4	TCCTCTGTCCTTTGCCTGAG AGTTTCACTCTGCATAT GCGCAGAG CTTGCTCCTTCGGCGACCGAT
RR007Gly2 F	TAATACGACTCACTATAGGGTTGAAGACTGCAGGAGAG
RR008Gly2 R	TCCTCTGTCCTTTGCCTGAG

Les séquences de même couleur correspondent aux mêmes séquences du PCR du riboswitch.

3.2.3 Visualisation des produits de PCR

Les produits de PCR amplifiés ont été visualisés sur gel d'agarose de 2%, préparé avec 40 ml de Tris Acétate EDTA (TAE) 1X (40 Mm Tris [pH 7.6], 1 mM EDTA et 20 mM acide acétique), 0,8 g d'agarose (Biobasis Canada) et 0,5 µL du GelRed 1000X. Le produit de PCR a été mélangé avec 1 µL de tampon de chargement, bleu de migration natif 6X. Après une migration de 45 min à 130V, le gel a été visualisé en utilisant l'appareil GelDoc.

3.2.4 Transcription chaude

Pour la réaction de transcription, l'ADN matrice a été mélangée avec le tampon de transcription TRX 5X (400 mM HEPES-KOH pH 7,5, 120 mM MgCl₂, 200 mM DTT, 10 mM spermidine), 2 mM des ribonucléotides (rNTPs) (A, C, G), 0,8 mM de rUTP, 0.75 pmol de rUTP radioactif, 1 U/µL pyrophosphatase (Sigma Aldrich, USA), 1 U/µL d'ARN polymérase T7, 1 U/µL d'inhibiteur de

Rnases (NEB) et le volume final a été ajusté avec de l'eau milliQ stérilisée. La réaction dure 2h à 37°C, après un traitement avec la DNase (RNase free, NEB) a été faite afin d'éliminer toute trace d'ADN pendant 30 min à 37°C. Le produit de la transcription a été précipité à l'éthanol, centrifugé et resuspendu dans l'eau. Par la suite une purification sur un PAGE a été faite.

4 RESULTATS

4.1 Sélection des aptamères contre le méthyl benzoate

4.1.1 Conception de la librairie d'ADN pour le SELEX

Dans ce travail des aptamères ont été sélectionnés contre le méthyl benzoate à partir de deux librairies par sélection *in vitro*. Le brin d'ADN matrice est formé par une région aléatoire de 50 nucléotides encadrés par deux parties constantes, de 18 nucléotides de long. Ces deux régions servent à des sites d'hybridation des amorces afin d'amplifier par PCR des séquences sélectionnées à chaque cycle.

ADN matrice (89 nts) :

5'-TGGCTCTGGCTTCCGTCC-N₅₀-CGAGAGAGCCGAAGCAGC-3'

Premier cycle de PCR :

5'-TGGCTCTGGCTTCCGTCC-N₅₀-CGAGAGAGCCGAAGCAGC-3'

← GCTCTCTCGGCTTCGTCGZAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-5'

Amorce anti-sens (38 nts)

Deuxième cycle de PCR :

Amorce sens (18 nts)

TGGCTCTGGCTTCCGTCC →

3'-ACCGAGACCGAAGGCAGG-N₅₀-GCTCTCTCGGCTTCGTCGZAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-5'

Le produit de PCR (ADNdb) :

5'-TGGCTCTGGCTTCCGTCC-N₅₀-CGAGAGAGCCGAAGCAGC-3'

3'-ACCGAGACCGAAGGCAGG-N₅₀-GCTCTCTCGGCTTCGTCGZAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-5'

Figure 4-1: Conception de la librairie et d'amorces pour SELEX.

Au cours de premier cycle de PCR l'amorce anti-sens (38 nts) est hybridée sur le brin d'ADN matrice et une élongation dans le sens 3' a été faite. Dans le deuxième cycle, l'amorce sens (18 nts) est fixée sur le brin nouvellement généré et l'enzyme ADN polymérase amplifie le brin complémentaire. L'ADN double brin a été amplifié pendant les cycles de PCR suivants.

4.1.2 Modification de la librairie d'ADN par chimie click

La librairie d'ADN a subi une modification par une réaction de chimie click avec une molécule hydrophobe, le 7-(diéthylamino) coumarin-3-carbonyl azide pour améliorer l'interaction avec les molécules cibles apolaires. Pour éliminer l'excès de ce dernier aussi bien que les autres composés de la réaction, une purification sur un gel de polyacrylamide dénaturant a eu lieu (Figure 4.2).

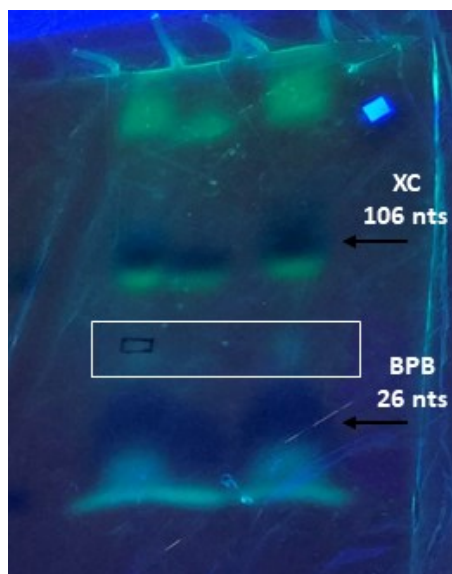


Figure 4-2: Séparation et purification de la librairie d'ADN après modification par chimie click.

Image d'un gel de polyacrylamide dénaturant 6% sous lumière bleue, le rectangle blanc encadrant les bandes correspond à la librairie située entre les deux colorants marqueurs de taille, le bleu de xylène de cyanol (XC) et le bleu de bromophénol (BPB).

La révélation du 7-(diéthylamino) coumarin-3-carbonyl azide est possible par exposition sous des rayons de lumière bleue grâce à la fluorescence de la molécule. Comme le montre la figure 4-2, le rectangle blanc désigne la partie de gel à prélever pour extraire l'ADN conjugué avec la molécule hydrophobe située entre les deux marqueurs de migration le XC et le BPB qui correspond respectivement à 106 et 26 nucléotides de long. L'utilisation d'ADN marqué radioactivement a permis aussi de valider la zone sélectionnée en superposant l'image du gel de purification scanné et le gel réel.

4.1.3 Immobilisation de molécules du méthyl 4-éthynylbenzoate sur des billes azides magnétiques

La sélection des aptamères a été réalisée en utilisant des billes magnétiques azides. La première étape consiste à l'immobilisation du ligand d'intérêt, le méthyl 4-éthynylbenzoate sur des billes présentant des groupements azide sur la surface par la réaction de chimie click. L'importance de cette étape nous pousse à valider la fixation de la cible sur le support. En effet, nous avons prouvé l'immobilisation de cible sur les billes magnétiques par mesure de l'intensité optique.

Une courbe d'étalonnage a été effectuée (**Figure 4.3**) pour calculer le nombre de mol de ligand fixé sur les billes en dosant la quantité existant dans le surnageant et les deux lavages par mesure d'absorbance à 259 nm.

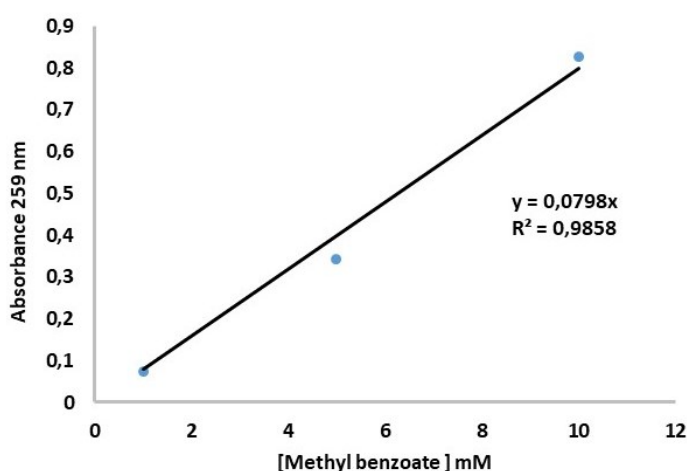


Figure 4-3: Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de méthyl 4-éthynylbenzoate.

A l'aide de l'équation : Absorbance = 0,0789 x Concentration de méthyl 4-éthynylbenzoate, nous pouvons calculer le nombre de moles de méthyl 4-éthynylbenzoate existant dans le surnageant et dans les deux lavages (**Tableau 4.1**). En effet, dans la réaction pour 5 nmoles de groupements azide nous avons utilisé 50 nmoles de méthyl 4-éthynylbenzoate afin de saturer tous les groupements.

Tableau 4-1: Valeurs d'absorbance optique, de concentration et de nombre de mole de méthyl 4-ethynylbenzoate dans le surnageant et les deux lavages.

	DO (259 nm)	Concentration (mM)	Nombre de mol (nmol)
Surnageant	0.02394	0.3	30
Lavage 1	0.00957	0.12	12
Lavage 2	0	0	0

Théoriquement juste 5 nmoles de méthyl 4-ethynylbenzoate peuvent être fixés, d'après ci-dessus 42 nmoles de méthyl 4-ethynylbenzoate se trouvent dans le surnageant et les lavages donc 8 nmoles sont fixés sur les billes. Cette valeur peut être due à une erreur au niveau de la mesure du Nanodrop, mais est tout de même indicatif que la réaction a fonctionné et que le nombre de groupements azide disponible pour la réaction était probablement supérieur à 5 nmoles.

4.1.4 PCR avec des amorces inégales

L'ADNsb peut adopter plusieurs conformations tertiaires complexes plus que l'ADN double brin, ce qui lui permet d'interagir davantage avec les cibles. Au cours de cycles de PCR, deux amorces ont été utilisées pour générer une librairie d'ADNdb avec deux brins de tailles inégales, grâce au connecteur PEG qui bloque la polymérisation. Les produits de PCR ont été purifiés sur gel de polyacrylamide dénaturant 6% afin de séparer les deux brins d'ADN (**Figure 4.4**). Les séquences d'ADN sb (89 nts) ont été purifiées à partir du gel.

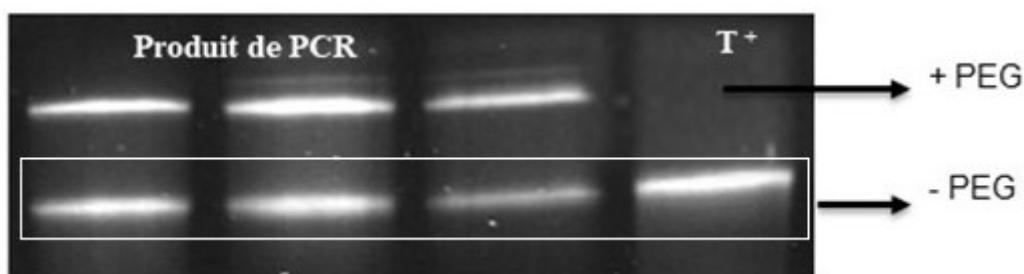


Figure 4-4: Visualisation des produits de PCR

Migration de produits de PCR avec des amorces inégales et un témoin positif de 89 nucléotides de longueur dans un gel de polyacrylamide dénaturant 6 %. Les bandes sont révélées sous UV après une incubation de 15 min dans le TBE 1X et du GelRed. Le rectangle blanc indique les bandes correspondant aux séquences d'ADNsb sans amorce-PEG qui seront utilisées dans le prochain cycle de SELEX.

4.1.5 Test d'affinité

Pour évaluer l'enrichissement et l'affinité des générations de SELEX, un test d'affinité a été réalisé. En premier lieu, les séquences aptamériques sont marquées radioactivement par ^{32}P . Après, une purification par PAGE élimine l'excès de ^{32}P et permet de purifier les séquences.

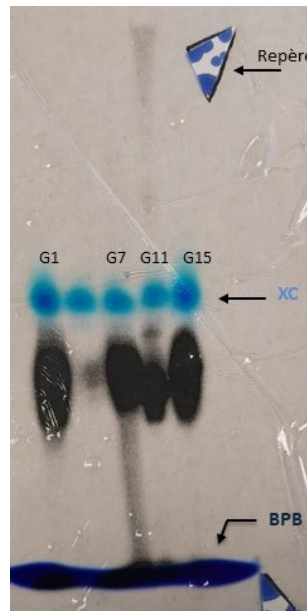


Figure 4-5: Purification par électrophorèse sur un PAGE des oligonucléotides marqué avec ^{32}P .

Image d'un gel de migration acrylamide 6% des séquences aptamériques de la librairie d'ADN classique superposée à la photo du gel imprimé en taille réelle. Des repères ont été utilisés permettant le positionnement des séquences pour couper les bandes de bonne taille.

L'enrichissement des librairies de SELEX a été validé par un test d'affinité par marquage radioactif (**Figure 4.6**) en quantifiant la radioactivité. Les résultats obtenus suggèrent que l'affinité vis-à-vis du méthyl benzoate augmente d'une génération de SELEX à une autre. En effet, le pourcentage de liaison augmente de 6,9% pour la première génération à 45% pour la quinzième génération de l'ADN classique et de 5,7% jusqu'à 10% pour la librairie d'ADN modifié.

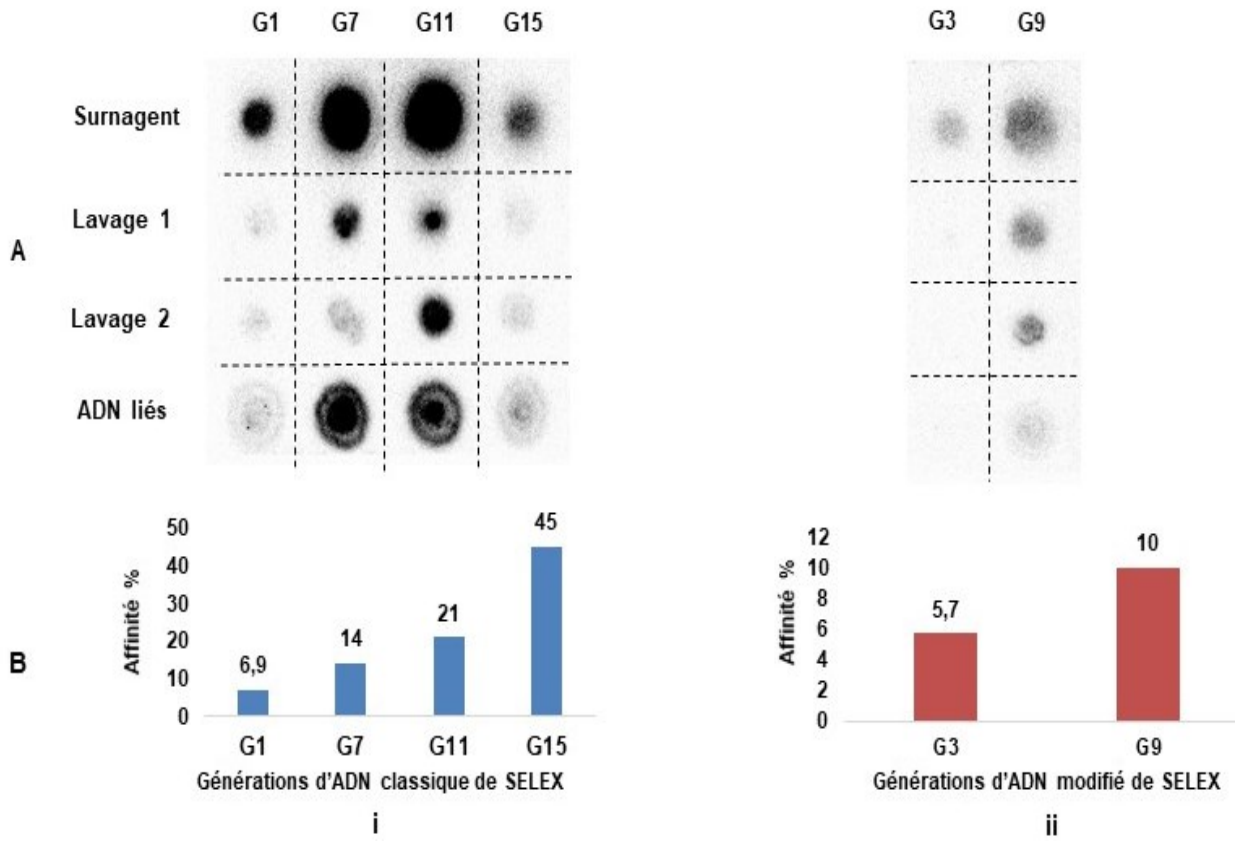


Figure 4-6: Évolution de l'affinité des bibliothèques durant le SELEX.

A : Taux de radioactivité révélé sur une plaque de phosphore après une exposition de 4h : de surnageant, de deux lavages et d'ADN liés déposés sur un papier Whatman. **B** : Quantification de l'intensité de la radioactivité observée en A. i : ADN classique, ii : ADN modifié.

Ces résultats étaient assez convaincants pour envoyer les générations au séquençage à haut débit afin de déterminer les aptamères potentiels et les différents motifs conservés.

4.1.6 Séquençage Sanger

Le séquençage Sanger des plasmides a été effectué pour une vingtaine de clones, 10 clones issus chacun de la dernière génération d'ADN classique et d'ADN modifié, en considérant deux lectures avec les amorces T7 et SP6. La Figure 4-7 ci-dessous présente un exemple de résultat de séquençage.

A : Lecture sens avec l'amorce T7

>ID|11170891 RRADNm1 de 36 à 846 :

```
CGGCCGCGGAATTCGATTTGGCTCTGGCTTCCGTCCAGGCCGCGAGATCGGGCGAGGGGAAAAAGGGCAGACAGGA
CCGGGAGAGCGAGAGAGCCGAAGCAGCAAATCACTAGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCC
CAACGCGTTGGATGCATGCTTGAGTATTCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTTC
GTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATAACGAGCCGGAAGCATAAAGTTAAAGCCTGGGGTGCCTAA
TGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCCAGTTCGGGAAACCTGTTCGTGCCAGCTGCA
TTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGC
TGCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGG
GATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTT
TTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC
TATAAAGATAACAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC
CTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGC
```

B : Lecture anti-sens avec l'amorce SP6

>ID|11170737 RRADNm1 de 38 à 777

```
TCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCGTTTGGAAACAAGAGTCCAC
TATTAAGAAGCTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCAC
CCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCT
TGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAG
TGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACACACCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTCGCCATT
CAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTG
CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAA
TACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCCGACGTCGCATGCTCCCGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTTG
GCTCTGGCTTCCGTCCAGGCCGCGAGATCGGGCGAAGGGGAAAAAGGGCAGACAGGACCGGGAGAGCGAGAGAGCCG
AAGCAGCAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCA
```

Figure 4-7: Résultat de séquençage Sanger pour un clone de la librairie d'ADN modifié.

A : Séquence issue de la lecture sens avec l'amorce T7. B : Séquence issue de la lecture anti-sens par l'amorce SP6. Code de couleurs : Rouge : les régions conservées de la séquence de référence (régions des amorces).

La **figure 4.8** présente le résultat d'alignement en utilisant le logiciel *Clustal Omega* pour déterminer la séquence aptamérique.

```

Rev          ATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTTGGCT 600
F           -----CGGCCGCGGGAATTCGATTTGGCT 24
Reference   -----TGGCT 5
                                         *****

Rev          CTGGCTTCCGTCCCAACGCAGCGGCAACCGGGGAAGACGGGAGGGACGCAGGAAGACC 658
F           CTGGCTTCCGTCCCAACGCAGCGGCAACCGGGGAAGACGGGAGGGACGCAGGAAGACC 82
Reference   CTGGCTTCCGTCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 65
           *****

Rev          CAGCGAGAGAGCCGAAGCAGCGCTGCTTCGGCTCTCTCGGGGGCCTGCTCTTCCGCGCT 718
F           CAGCGAGAGAGCCGAAGCAGCGCTGCTTCGGCTCTCTCGGGGGCCTGCTCTTCCGCGCT 142
Reference   NNNCGAGAGAGCCGAAGCAGC----- 86
           *****

```

Figure 4-8: Résultat de l'alignement des séquences.

Le logiciel *Clustal Omega* permet l'alignement entre les séquences issues de deux sens de lecture et la séquence de référence.

On a réussi à avoir juste deux séquences d'aptamères potentiels issues de la librairie modifiée (**Tableau 4.2**). La première séquence est de 84 nucléotides de long et la deuxième contient 86 nucléotides dont un modifié (coloré en bleu). Par contre, il y avait un problème au niveau du séquençage des séquences d'ADN de la librairie classique et aucune séquence n'a été obtenue.

Tableau 4-2: Séquences d'aptamères potentiels issus de la librairie modifiée.

Nom	Séquence 5'-3'
Séquence 1	TGGCTCTGGCTTCCGTCCCAACGCAGCGGCAACCGGGGAAGACGGGAGGG ACGCAGGAAGACCCAGCGAGAGAGCCGAAGCAGC
Séquence 2	TGGCTCTGGCTTCCGTCCAGGCCGCGAGATCGGGCGAAGGGGAAAAGGG CAGACAGGACCGGGAGAGCGAGAGAGCCGAAGCAGC

La nucléotide T coloré en bleu, est un nucléotide modifié dU*TP réellement.

4.1.7 Prédiction de la structure secondaire

Pour étudier les séquences atamériques générées au cours du processus de SELEX, la structure secondaire peut donner une idée sur l'enchaînement et l'appariement des nucléotides permettant la formation d'une conformation spécifique (des tiges et des boucles) responsable de la liaison avec la molécule cible. La structure secondaire de deux séquences a été prédite par le logiciel

mFold (**Figure 4.9**). On remarque une faible abondance de nucléotides modifiés dans les séquences. En effet, la séquence 1 n'a aucun nucléotide modifié et la séquence 2 ne contient qu'un nucléotide thymidine dans la trentième position. Donc une position où la fixation du 7-(diéthylamino) coumarin-3-carbonyl azide contribue peut-être à une pochette de liaison hydrophobe. De plus, l'utilisation de l'application G4Hunter pour la prédiction de G-quadruplex a montré la présence de trois G-quadruplexes potentiels pour Apt 2 et juste une pour Apt 1 (**Figure 4-10**).

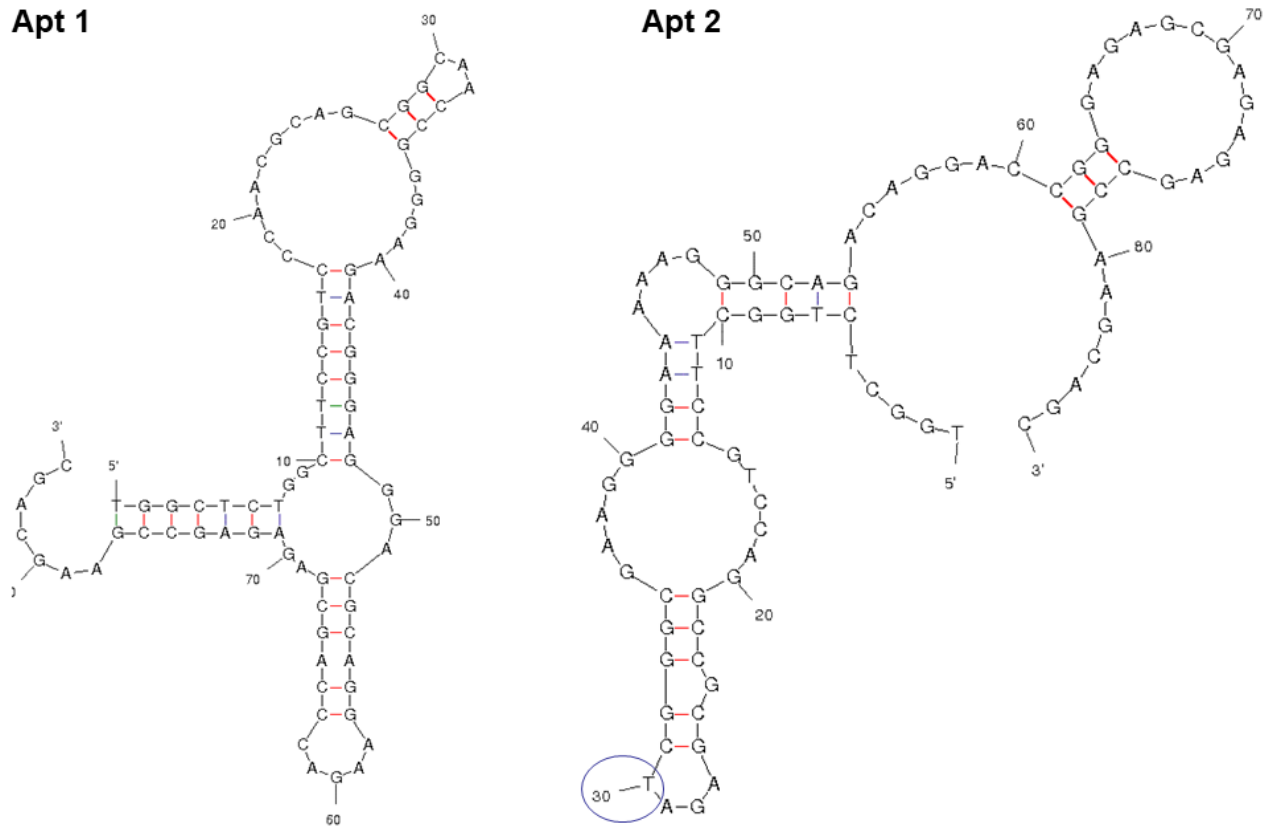


Figure 4-9: Structure secondaire de deux séquences d'aptamère.

Analysis settings		Analysis results		Export CSV		Sequence info	
Window size: 25	Threshold: 1	Quadruplexes found: 3	Frequency: 34,9 / 1000 bp	Individual	Grouped	Apt2	86 bp
						GC: 57 (66,3%)	
Position	Length	Sequence	Score chart	G4Hunter score (abs)			
18	26	AGGCCGCGAGATCGGGCGAAGGGGAA		1		kill	
23	37	GCGAGATCGGGCGAAGGGGAAAAAGGGCAGACAGGAC		0,973		kill	
37	28	AGGGGAAAAAGGGCAGACAGGACCGGGA		1,179		kill	

Figure 4-10: Capture d'écran du résultat d'analyse de la séquence d'Apt 2 par le logiciel G4Hunter.

4.1.8 Détermination de la constante de dissociation de deux clones par fluorescence

La détermination de la constante de dissociation (K_d), nous permet de comparer l'affinité de deux aptamères potentiels. Les aptamères ont été incubés avec plusieurs concentrations de méthyl benzoate et une mesure thermophorèse à micro-échelle (*microscale thermophoresis*, MST), grâce à la fluorescence du Cy5, a été réalisée par la suite. La figure ci-dessous résume les résultats de l'expérience, les courbes de saturation et les valeurs de K_d sont obtenus directement grâce à l'appareil Monolith NT.115 Pico.

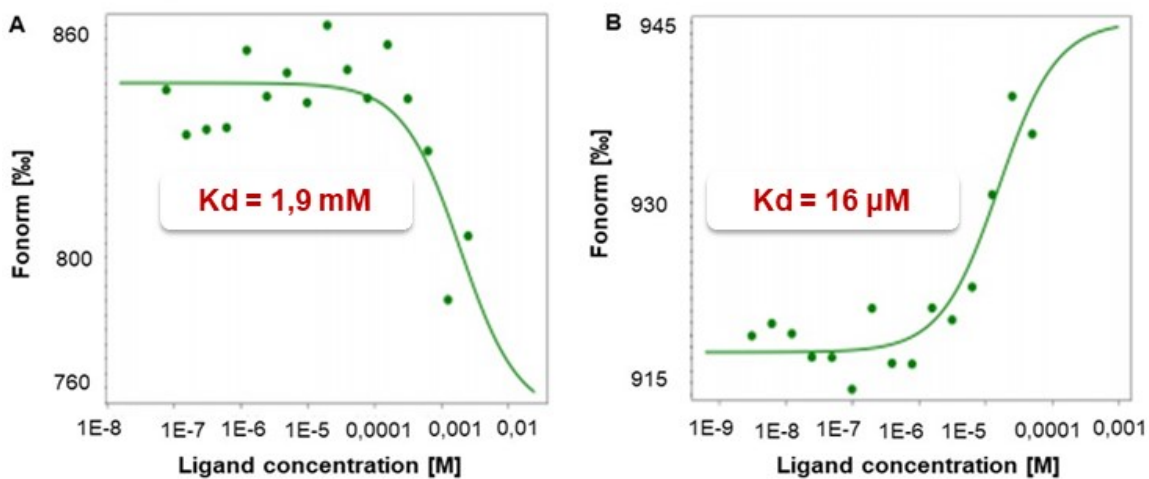


Figure 4-11 : Affinité des aptamères pour le méthyl benzoate.

A: Apt 1, B: Apt 2 modifiée avec la molécule du coumarin. Fonorm : la fluorescence normalisée. Mesure de la force d'interaction entre l'aptamère et le méthyl benzoate en détectant un signal fluorescent de Cy5 de l'aptamère suite à un changement de température induit par la lumière infrarouge.

Les aptamères Apt 2 et Apt 1 présentent des Kd de l'ordre du micromolaire et du millimolaire, respectivement. Ceci reflète une meilleure affinité de Apt 2 vis-à-vis le méthyl benzoate.

4.1.9 Analyse des résultats de séquençage à haut débit

L'analyse bioinformatique des résultats de séquençage à haut débit des aptamères potentiels a été faite par le programme Aptasuite permettant d'aligner des milliers de séquences et déterminer leurs abondances dans chaque génération de SELEX, en plus d'identifier les motifs et les structures potentiels.

Pour la librairie d'ADN modifié, la majorité des séquences possèdent la taille attendue avec une région aléatoire de 50 nucléotides de long (**Figure 4-11**). Pour la librairie d'ADN classique, nous trouvons plusieurs séquences aptamériques possédant une région aléatoire entre 1 et 138 nucléotides, mais la plus grande proportion correspond à 57 nucléotides, présentant la taille de la région aléatoire attendue. Cette incohérence des tailles pourrait être due à des problèmes au niveau des PCR de séquençage, puisqu'à chaque génération SELEX, les produits de PCR étaient purifiés sur gel et devaient donc avoir la bonne taille.



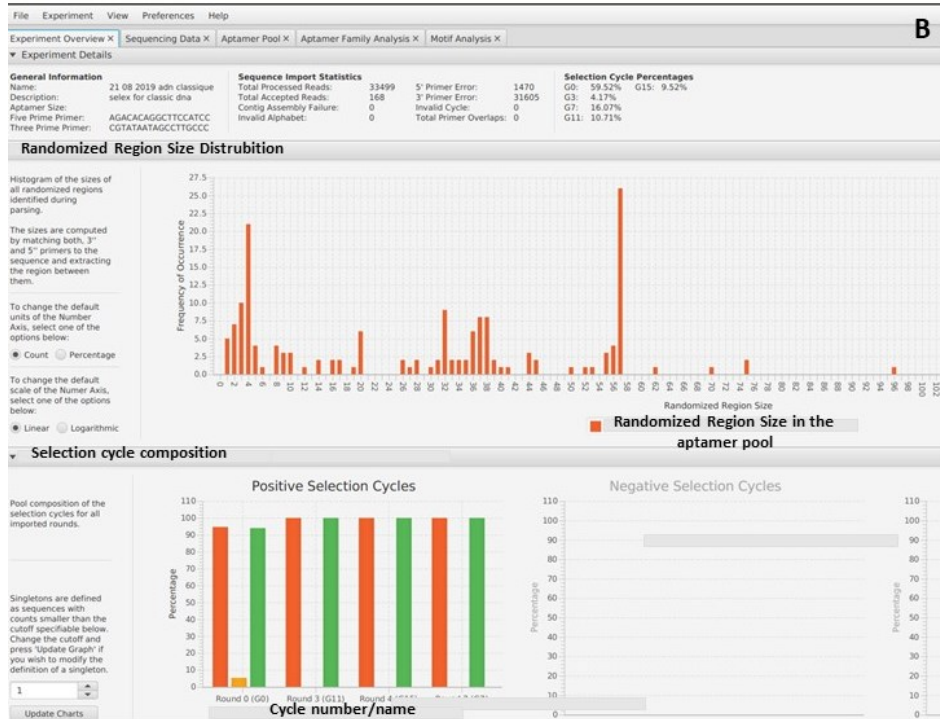


Figure 4-12: Capture d'écran de l'interface de logiciel Aptasuite.

A : Librairie d'ADN modifié, B : librairie d'ADN classique. L'interface comporte des informations sur la distribution de la taille de la région aléatoire et la composition de chaque cycle.

Pour les deux types de librairie, nous n'avons trouvé aucun motif ou cluster abondant. Seulement pour la librairie d'ADN modifié, il existe quelques séquences en double dans la onzième génération. Ceci reflète un niveau faible d'enrichissement, ou du moins montre assez clairement que nous n'avons pas atteint un plateau d'efficacité des aptamères.

4.2 SR-PAGE une nouvelle méthode de sélection

La validation de la méthode de SR-PAGE est considérée comme une étape primordiale afin de l'intégrer dans le processus de sélection. Ceci donne une nouvelle alternative pour cibler des molécules en solution comme le THC, ses métabolites et d'autres drogues.

4.2.1 Création de différentes constructions de riboswitchs connus

Afin de valider la méthode de SR-PAGE plusieurs riboswitchs connus ont été testés. Pour les riboswitchs FMN, Fluor, c-di-GMP et Nickel/Cobalt, cinq constructions ont été testées (**Figure 4.13**). Pour les riboswitchs glycine et TPP juste la séquence correspondant au domaine aptamère a été testée. À noter que la majorité des constructions de riboswitchs, sauf celui de la glycine, ont été faites par une collègue de laboratoire : Aurélie Devinck.

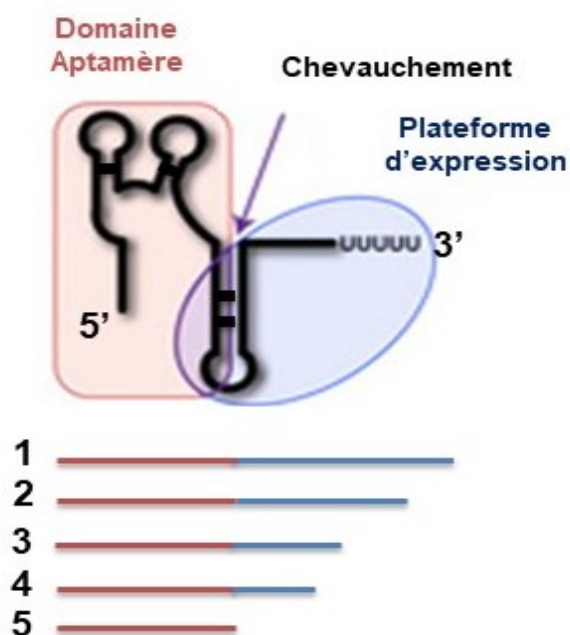


Figure 4-13 : Représentation schématique de différentes constructions de riboswitchs. Adapté de (Edwards & Batey, 2010).

Pour valider la méthode de SR-PAGE plusieurs constructions de riboswitchs connus ont été faites par PCR. La première construction correspond à la séquence de riboswitch au complet, la deuxième, la troisième et la quatrième contiennent le domaine aptamère au complet et une partie de la plateforme d'expression avec une différence de taille d'une construction à une autre. La cinquième construction correspond juste à la séquence du domaine aptamère.

4.2.2 Synthèse *in vitro* de l'ADN matrice de riboswitch glycine

Après avoir réalisé une PCR d'assemblage, une migration dans gel d'agarose a été faite afin de visualiser les produits d'amplification (**Figure 4.13**). La séquence de l'ADN matrice de riboswitch glycine (**Tableau 4.3**), issue de l'assemblage de deux séquences de 123 nts et 136 nts, est de 245 nucléotides.

Tableau 4-3: Séquence complète de riboswitch glycine.

Nom	Séquence 5'-3'
Rioswitch glycine	TAATACGACTCACTATAGGGTTGAAGACTGCAGGAGAGTGGTTGTTAACC AGATTTTAAACATCTGAGCCAAATAACCCGCCGAAGAAGTAAATCTTTCAGG TGCATTATTCTTAGCCATATATTGGCAACGAATAAGCGAGGACTGTAGTTG GAGGAACCTCTGGAGAGAACCGTTTAATCGGTCCCGAAGGAGCAAGCT CTGCGCATATGCAGAGTGAAACTCTCAGGCCAAAAGGACAGAGGA

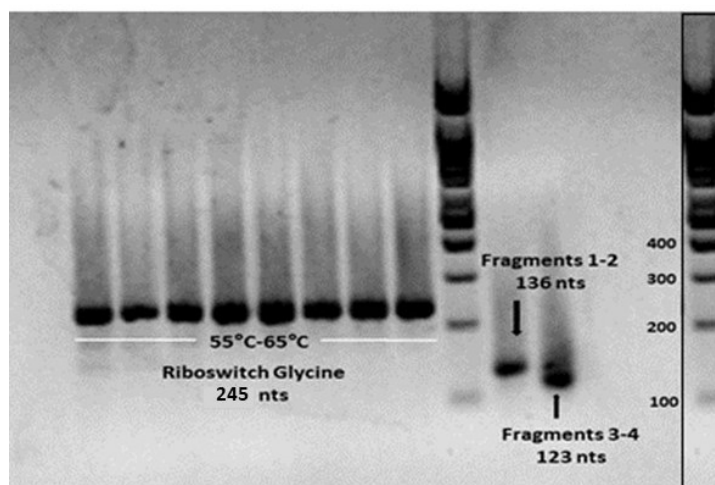


Figure 4-14: Visualisation de de produit de PCR par le GelDoc

Migration de l'ADN matrice du riboswitch glycine produit par PCR d'assemblage dans un gel agarose 2% en présence d'un marqueur de taille 100 pb. Dans un premier temps, les fragment 1- 2 et fragment 3-4 ont été assemblés pour donner respectivement un fragment de 136 et 123 nucléotides de taille. Finalement, une deuxième amplification a été réalisée en présence des amorces RR007Gly2 F et RR008Gly2 R et des deux fragments déjà assemblés pour générer la séquence du riboswitch au complet de 245 nts.

4.2.3 Migration SR-PAGE des riboswitchs connus

Plusieurs gels ont été réalisés en ajoutant un seul ligand potentiel (**Figure 4.15**) qui interagira normalement avec un seul riboswitch à chaque fois en gardant les autres riboswitchs comme témoins négatifs. Donc, cette fois-ci on attend un décalage au niveau de la deuxième migration d'une ou plusieurs constructions du riboswitch d'intérêt en présence de sa molécule cible. Ce décalage dû à un changement structural de la séquence d'ARN grâce à l'interaction ligand-riboswitch. Dans ce cas trois situations peuvent être possibles :

- L'interaction ligand-riboswitch rend la structure plus compacte ce qui accélèrera la migration, donc un décalage en haut de la ligne de base.
- L'interaction ligand-riboswitch rend la structure moins compacte, ce qui provoquera une diminution de la vitesse de migration, donc un décalage en bas du niveau des puits.
- L'interaction ligand-riboswitch n'affectera pas suffisamment la structure pour induire un changement de migration (comme cela semble être le cas pour les constructions testées du riboswitch fluor).

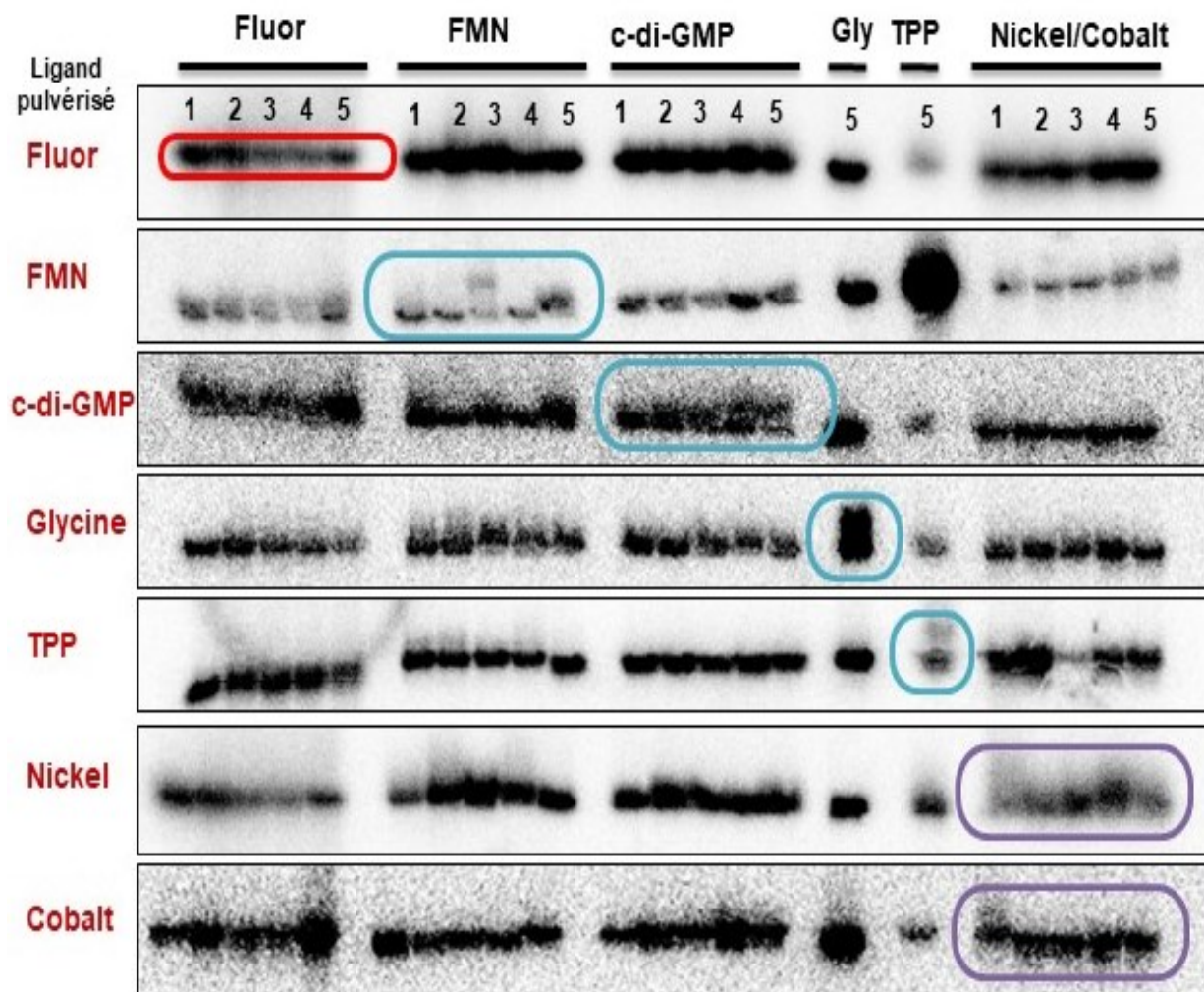


Figure 4-15: Scan des gels de SR-PAGE.

Pour chaque gel un seul ligand a été pulvérisé afin d'interagir avec les différentes constructions de riboswitch d'intérêt, les autres riboswitchs servent comme témoins de migration.

Code de couleur :

- **Les rectangles rouges** : pas de décalage
- **Les rectangles bleus** : il y a un décalage
- **Les rectangles mauves** : plus moins un décalage

Comme constaté dans la figure aucune construction du riboswitch fluor n'a été décalée en présence de son ligand. Un décalage en haut de la ligne de base a été obtenu pour les riboswitchs FMN, c-di-GMP, glycine et TPP, précisément au niveau de la troisième construction pour le riboswitch FMN, de même que la quatrième et la cinquième construction pour le riboswitch c-di-GMP. Apparemment, la liaison riboswitch-ligand rendrait la structure plus compacte ce qui

causerait une plus grande vitesse de migration dans le gel. Pour le riboswitch Nickel/Cobalt, le décalage n'est pas trop clair en présence de ligand nickel et cobalt chacun à part.

Le but ultime de l'optimisation et de la validation de SR-PAGE est l'intégration de cette méthode dans le processus de sélection *in vitro*, le SELEX. Pour ce faire nous voulons confirmer la validité de la méthode même en présence de plusieurs ligands à la fois. Un mélange de ligand a été pulvérisé sur le gel contenant du FMN, c-di-GMP, TPP, glycine et nickel.

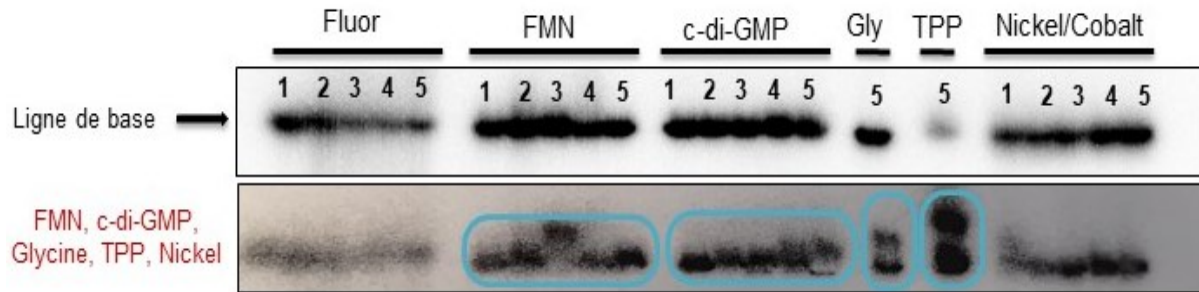


Figure 4-16: scan d'un gel de SR-PAGE en présence de plusieurs ligands à la fois

D'après la figure ci-dessus (**Figure 4.16**) un shift a eu lieu pour les mêmes constructions qui ont été testées séparément. Ceci confirme la faisabilité de la méthode même en présence de plusieurs ligands.

5 DISCUSSION

5.1 Sélection des aptamères contre le méthyl benzoate

Dans cette partie, on vise à sélectionner des aptamères contre le méthyl benzoate, une molécule hydrophobe dérivée de la cocaïne, en effet plusieurs recherches précédentes ont pu identifier des aptamères contre la molécule de la cocaïne (Stojanovic *et al.*, 2001). Toutefois, nous avons eu l'avantage d'identifier pour la première fois des aptamères contre le méthyl benzoate. En effet, sa volatilité fait en sorte qu'elle est la principale molécule reconnue par les chiens policiers, ce qui rend le méthyl benzoate une meilleure cible à choisir dans l'optique de la détection du trafic de drogue.

Des études ont eu recours à ajouter de nouveaux nucléotides supplémentaires. Une paire de bases artificielles a été ajoutée (Z et P) en conservant les autres quatre bases azotées canoniques standards afin d'augmenter la diversité au lieu de changer un nucléotide par un autre modifié (Sefah *et al.*, 2014). Le protocole de SELEX utilisé par ces derniers ne nécessite pas une étape supplémentaire de fonctionnalisation de nucléotide modifié par chimie click dans chaque cycle. Cependant, le séquençage des sous-librairies enrichies serait laborieux, voire impossible, à cause de la non-disponibilité des bases supplémentaires dans le commerce. Notre approche d'utilisation de nucléotides modifiés réduit les problèmes d'incompatibilité enzymatique en brisant la liaison azide-alcyne à haute température pendant l'étape d'amplification par PCR (Pfeiffer *et al.*, 2018).

Environ une dizaine des cycles de sélection est suffisante pour l'obtention des aptamères potentiels. De plus, des recherches ont réussi à réaliser le SELEX en une seule génération, en sélectionnant des aptamères en une seule interaction avec la cible (Kupakuwana *et al.*, 2011). Néanmoins, le nombre de cycles reste toujours relatif. En effet, plusieurs paramètres peuvent affecter le processus comme la méthode de sélection, les conditions de SELEX (temps d'incubation, les tampons...) et la molécule cible. Aucun motif ou cluster abondant n'a été identifié par l'analyse bioinformatique de quelques générations de SELEX. Pour la librairie d'ADN modifié, on a trouvé juste quelques séquences en double dans la onzième génération. Ceci reflète un taux d'enrichissement faible.

Dans une telle situation les doutes peuvent se pointer en premier lieu sur la méthode de sélection choisie et en deuxième lieu sur le nombre de cycle de sélection réalisé. D'ailleurs, nous avons utilisé une méthode de sélection couramment utilisée, avec la cible immobilisée sur des billes

magnétiques. On a varié plusieurs paramètres afin d'augmenter la stringence du SELEX : le temps d'incubation et le ratio ADN-cible ont été variés tout au long du processus. Des sélections négatives ont été aussi effectuées afin d'éliminer les séquences non-spécifiques présentant une affinité aux billes magnétiques. Bien que les résultats du test d'affinité par marquage radioactif suggèrent une évolution positive de l'affinité pour les générations successives des bibliothèques, on n'a pas obtenu un plateau d'enrichissement. Ceci pourrait expliquer l'absence de motifs sur-représentés et de clusters abondants dans les dernières générations analysées par Aptasuite. De ce fait, quelques cycles de sélections supplémentaires sont suggérés afin d'obtenir les aptamères potentiels. Nous avons poursuivi la sélection et espérons que les résultats de séquençage démontreront un plus grand enrichissement de plusieurs séquences d'aptamères.

Un clonage suivi d'un séquençage Sanger nous a permis d'identifier deux séquences d'aptamères potentiels. Une faible présence de nucléotides modifiés a été remarquée dans ces dernières. En effet, juste l'aptamère Apt 2 présente un nucléotide modifié. De ce fait, il semble que la sélection favorise les aptamères ayant un nombre réduit de nucléotides modifiés. Ceci pourrait être dû à une moins grande efficacité à utiliser les dUTP-ethenyl lors de la polymérisation, ou simplement être dû au fait que ces nucléotides sont moins abondants que les autres bases dans la synthèse de départ (A:C:G:U* avec les ratios 5:5:5:1).

La séquence Apt 2 modifiée présente plus d'affinité que la séquence Apt 1 vis-à-vis le méthyle benzoate. Cela pourrait suggérer que la modification de l'aptamère par ajout d'une molécule hydrophobe, un dérivé de coumarin dans notre cas, rendrait l'aptamère plus performant pour former une poche de liaison hydrophobe, supportant ainsi notre hypothèse, mais il faudrait plus d'exemples pour déterminer ceci de façon plus conclusive.

5.2 SR-PAGE une nouvelle méthode de sélection

L'objectif principal de cette partie était l'optimisation et la validation de la méthode de SR-PAGE en utilisant différentes constructions des riboswitchs connus. Un décalage vers le haut a été obtenu pour la deuxième migration pour les riboswitchs FMN, c-di-GMP, glycine et TPP en testant chaque ligand séparément (ou ensemble), suggérant un changement de conformation rendant la structure des riboswitch plus compacte en présence de leur ligand.

Pour le riboswitch Nickel/Cobalt, le décalage n'était pas trop clair en présence du ligand nickel ou cobalt chacun pris à part. Donc aucune construction de riboswitch n'a clairement changé de structure en présence de ligand. Une construction avec un meilleur potentiel de changement de

structure que les cinq constructions montrées sont peut-être possibles, mais n'a pas été testés. Pour cela nous faisons une librairie présentant plus de constructions afin de voir le *shift*.

Nous pouvons maintenant confirmer la faisabilité de la méthode de SR-PAGE comme une partie intégrante dans le processus de SELEX comme une étape de sélection en utilisant un seul ligand ou plusieurs à la fois, donc possibilité de réaliser un SELEX multiplex (sélection d'aptamères contre plusieurs cibles). La technique présente plusieurs points positifs par rapport à d'autres méthodes de sélection. En effet, nous pouvons utiliser des cibles non immobilisées sur un support solide présentant une alternative aux autres techniques traditionnelles de chromatographie de sélection qui utilise souvent des colonnes. En outre, la méthode de SR-PAGE permet la sélection d'aptamères qui ont une propension à changer de conformation en liant leur ligand, ce qui est avantageux pour la majorité des applications des aptamères. En plus, la sélection est faite contre la molécule cible elle-même sans réaliser des modifications étant donné que les cibles ne sont pas fixées sur une colonne ou immobilisées sur des billes (magnétiques, streptavidine...). Nous évitons du même coup les problèmes d'encombrement stérique. Finalement, l'utilisation d'une méthode « en solution » permet l'implication de tous les groupements actifs de la cible dans la pochette de liaison aptamère-cible.

Certainement chaque méthode possède des inconvénients. Le SR-PAGE est une méthode laborieuse qui nécessite des conditions bien déterminées, une température de 4°C pour conserver les structures secondaires et un voltage constant. En outre, la technique est limitante du point de vue du temps de manipulation. En effet, un cycle de sélection dure à peu près une semaine alors que deux jours sont suffisants pour réaliser un cycle de SELEX en utilisant des billes magnétiques.

6 Conclusion et perspectives

Le travail réalisé dans le cadre de ce projet visait à réaliser deux objectifs principaux :

- La sélection d'aptamères contre le méthyl benzoate afin de faciliter la détection du trafic de drogue.
- La validation et l'optimisation de la méthode de SR-PAGE, une technique qui pourrait être intégrée dans le processus de SELEX.

Pour la première partie, il a été possible de réaliser une sélection *in vitro* contre le méthyl benzoate en utilisant deux types de bibliothèques. L'évolution de l'affinité des sous-bibliothèques enrichies a été validée par un test d'affinité par marquage radioactif. Finalement, on a réussi à sélectionner deux aptamères d'ADN modifié après avoir réalisé un clonage suivi d'un séquençage Sanger. La détermination de la constante de dissociation des deux aptamères a montré que Apt 2 a une meilleure affinité que Apt 1. Ceci suggère que la modification de l'ADN peut le rendre plus performant.

L'analyse bioinformatique du séquençage à haut débit des quelques générations de SELEX par le programme Aptasuite n'a pas permis de trouver des motifs abondants reflétant un taux d'enrichissement faible. Nous envisagerons donc d'ajouter quelques générations de SELEX afin d'atteindre un taux d'enrichissement maximal et avoir de meilleurs aptamères. De plus, un test d'affinité sera réalisé pour Apt 2 sans modification par chimie click pour évaluer l'importance de la modification. D'autres tests d'affinité seront effectués en utilisant une molécule de structure chimique semblable au méthyl benzoate afin de déterminer la spécificité d'Apt2.

Dans la deuxième partie, on a réussi à valider la méthode de SR-PAGE en utilisant des riboswitchs connus permettant de faire des contrôles positifs. On a validé aussi la méthode en utilisant plusieurs ligands à la fois pour voir le potentiel de réaliser un SELEX en multiplex (la sélection de plusieurs ligands en même temps).

Dans les perspectives de nos travaux, des cycles de sélection sont envisagés en utilisant le SR-PAGE comme méthode de sélection pour détecter d'autres métabolites de drogues comme le THC, THC-COOH et d'autres molécules.

7 BIBLIOGRAPHIE

- Académie européenne des patients (*Types d'études réalisées dans le cadre du développement clinique précoce*). <https://www.eupati.eu/fr/developpement-et-essais-cliniques/types-detudes-realisees-dans-le-cadre-du-developpement-clinique-precoce/>
- Agurell S, Halldin M, Lindgren J, Ohlsson A, Widman M, Gillespie H & Hollister L (1986) Pharmacokinetics and metabolism of delta 1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacological reviews* 38(1):21-43.
- Ahmad KM, Oh SS, Kim S, McClellan FM, Xiao Y & Soh HT (2011) Probing the limits of aptamer affinity with a microfluidic SELEX platform. *PloS one* 6(11):e27051.
- Bae H, Ren S, Kang J, Kim M, Jiang Y, Jin MM, Min IM & 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.
- Baker BR, Lai RY, Wood MS, Doctor EH, Heeger AJ & Plaxco KW (2006) An electronic, aptamer-based small-molecule sensor for the rapid, label-free detection of cocaine in adulterated samples and biological fluids. *Journal of the American Chemical Society* 128(10):3138-3139.
- Benner SA (2004) Understanding nucleic acids using synthetic chemistry. *Accounts of Chemical Research* 37(10):784-797.
- Birch JR & Racher AJ (2006) Antibody production. *Advanced drug delivery reviews* 58(5-6):671-685.
- Brázda V, Kolomazník J, Lýsek J, Bartas M, Fojta M, Šťastný J & Mergny J-L (2019) G4Hunter web application: a web server for G-quadruplex prediction. *Bioinformatics*.
- Bruno JG, Carrillo MP, Phillips T & Andrews CJ (2010) A novel screening method for competitive FRET-aptamers applied to E. coli assay development. *Journal of fluorescence* 20(6):1211-1223.
- Burke DH, Hoffman DC, Brown A, Hansen M, Pardi A & Gold L (1997) RNA aptamers to the peptidyl transferase inhibitor chloramphenicol. *Chemistry & biology* 4(11):833-843.
- Cekan P, Jonsson EÖ & Sigurdsson ST (2009) Folding of the cocaine aptamer studied by EPR and fluorescence spectroscopies using the bifunctional spectroscopic probe C. *Nucleic acids research* 37(12):3990-3995.
- Celebanska A, Chiniforooshan Y, Janik M, Mikulic P, Sellamuthu B, Walsh R, Perreault J & Bock WJ (2019) Label-free cocaine aptasensor based on a long-period fiber grating. *Optics letters* 44(10):2482-2485.

- Chalmers A (2007) Cargo identification algorithms facilitating unmanned/unattended inspection at high throughput portals. *Unmanned/Unattended Sensors and Sensor Networks IV*. International Society for Optics and Photonics, p 67360M.
- Cho M, Xiao Y, Nie J, Stewart R, Csordas AT, Oh SS, Thomson JA & Soh HT (2010) Quantitative selection of DNA aptamers through microfluidic selection and high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(35):15373-15378.
- Cone EJ (1993) Saliva testing for drugs of abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences* 694(1):91-127.
- Cruz-Aguado JA & Penner G (2008) Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer. *Journal of agricultural and food chemistry* 56(22):10456-10461.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A & Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258(5090):1946-1949.
- Dong L, Zhou H, Zhao M, Gao X, Liu Y, Liu D, Guo W, Hu H, Xie Q & Fan J (2018) Phosphorothioate-Modified AP613-1 Specifically Targets GPC3 when Used for Hepatocellular Carcinoma Cell Imaging. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 13:376-386.
- Edwards AL & Batey RT (2010) Riboswitches: A common RNA regulatory element. *Nature Education* 3(9):9.
- El-Sagheer AH & Brown T (2010) Click chemistry with DNA. *Chemical Society Reviews* 39(4):1388-1405.
- Ellington AD & Szostak JW (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *nature* 346(6287):818.
- Ewing RG, Atkinson DA, Eiceman G & Ewing G (2001) A critical review of ion mobility spectrometry for the detection of explosives and explosive related compounds. *Talanta* 54(3):515-529.
- Fan L, Zhao G, Shi H, Liu M & Li Z (2013) A highly selective electrochemical impedance spectroscopy-based aptasensor for sensitive detection of acetamidrid. *Biosensors and Bioelectronics* 43:12-18.
- Ferreira CS & Missailidis S (2007) Aptamer-based therapeutics and their potential in radiopharmaceutical design. *Brazilian archives of biology and technology* 50(SPE):63-76.
- Fukuda K, Vishinuvardhan D, Sekiya S, Kakiuchi N, Shimotohno K, Kumar P & Nishikawa S (1997) Specific RNA aptamers to NS3 protease domain of hepatitis C virus. *Nucleic acids symposium series*. p 237-238.
- Furton KG, Hong Y-c, Hsu Y-L, Luo T, Rose S & Walton J (2002) Identification of odor signature chemicals in cocaine using solid-phase microextraction-gas chromatography and detector-dog response to

- isolated compounds spiked on US paper currency. *Journal of chromatographic science* 40(3):147-155.
- Garrett ER (1979) Pharmacokinetics and disposition of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and its metabolites. *Marihuana Biological Effects*, Elsevier. p 105-121.
- Gawande BN, Rohloff JC, Carter JD, von Carlowitz I, Zhang C, Schneider DJ & Janjic N (2017) Selection of DNA aptamers with two modified bases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(11):2898-2903.
- Gopinath SC, Hayashi K & Kumar PK (2012) Aptamer that binds to the gD protein of herpes simplex virus 1 and efficiently inhibits viral entry. *Journal of virology* 86(12):6732-6744.
- Gopinath SC, Kawasaki K & Kumar PK (2005) Selection of RNA-aptamer against human influenza B virus. *Nucleic Acids Symposium Series*. Oxford University Press, p 85-86.
- Group ES (2002) Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina* 22(2):143-152.
- Group ES (2003) Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology* 110(5):979-986.
- Harder S & Rietbrock S (1997) Concentration-effect relationship of delta-9-tetrahydrocannabinol and prediction of psychotropic effects after smoking marijuana. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 35(4):155-159.
- Hoinka J, Backofen R & Przytycka TM (2018) AptaSUITE: a full-featured bioinformatics framework for the comprehensive analysis of aptamers from HT-SELEX experiments. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 11:515-517.
- Huestis MA, Henningfield JE & Cone EJ (1992) Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THCCOOH during and after smoking marijuana. *Journal of analytical Toxicology* 16(5):276-282.
- Huestis MA & Smith ML (2018) Cannabinoid markers in biological fluids and tissues: revealing intake. *Trends in molecular medicine* 24(2):156-172.
- Hunt CA & Jones RT (1980) Tolerance and disposition of tetrahydrocannabinol in man. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 215(1):35-44.
- Inserm (2001) Pharmacocinétique et méthodes de dosage du D9-THC. *Cannabis: quels effets sur le comportement et la santé?*, Inserm (Édit.) Inserm, Paris. p 143-164.

- Ireson CR & Kelland LR (2006) Discovery and development of anticancer aptamers. *Molecular cancer therapeutics* 5(12):2957-2962.
- Jayasena SD (1999) Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical chemistry* 45(9):1628-1650.
- Johnson EL, Zhang D & Emche SD (2005) Inter-and intra-specific variation among five *Erythroxylum* taxa assessed by AFLP. *Annals of botany* 95(4):601-608.
- Kaushik AK & Dixit CK (2016) *Nanobiotechnology for sensing applications: from lab to field*. CRC Press,
- Kim Y-J, Kim YS, Niazi JH & Gu MB (2010) Electrochemical aptasensor for tetracycline detection. *Bioprocess and biosystems engineering* 33(1):31.
- Kupakuwana GV, Crill II JE, McPike MP & Borer PN (2011) Acyclic identification of aptamers for human alpha-thrombin using over-represented libraries and deep sequencing. *PloS one* 6(5):e19395.
- Lai H, Corbin I & Almirall JR (2008) Headspace sampling and detection of cocaine, MDMA, and marijuana via volatile markers in the presence of potential interferences by solid phase microextraction–ion mobility spectrometry (SPME-IMS). *Analytical and bioanalytical chemistry* 392(1-2):105-113.
- Lauridsen LH, Doessing HB, Long KS & Nielsen AT (2018) A Capture-SELEX strategy for multiplexed selection of RNA aptamers against small molecules. *Synthetic Metabolic Pathways*, Springer. p 291-306.
- Li X, An Y, Jin J, Zhu Z, Hao L, Liu L, Shi Y, Fan D, Ji T & Yang CJ (2015) Evolution of DNA aptamers through in vitro metastatic-cell-based systematic evolution of ligands by exponential enrichment for metastatic cancer recognition and imaging. *Analytical chemistry* 87(9):4941-4948.
- Lim Y, Kouzani A & Duan W (2009) Aptasensors design considerations. *International Symposium on Intelligence Computation and Applications*. Springer, p 118-127.
- Lorenzo N, Wan T, Harper RJ, Hsu Y-L, Chow M, Rose S & Furton KG (2003) Laboratory and field experiments used to identify *Canis lupus var. familiaris* active odor signature chemicals from drugs, explosives, and humans. *Analytical and bioanalytical chemistry* 376(8):1212-1224.
- Louis Blouin (2017) Cannabis, cocaïne ou opioïdes détectés grâce à la salive.
- Malyshev DA, Dhimi K, Lavergne T, Chen T, Dai N, Foster JM, Corrêa IR & Romesberg FE (2014) A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet. *Nature* 509(7500):385.
- Mendelson JH & Mello NK (1984) Effects of marijuana on neuroendocrine hormones in human males and females. *NIDA Res Monogr* 44:97-114.
- Mosing RK & Bowser MT (2009) Isolating aptamers using capillary electrophoresis–SELEX (CE–SELEX). *Nucleic Acid and Peptide Aptamers*, Springer. p 33-43.

- Mufhandu HT, Gray ES, Madiga MC, Tumba N, Alexandre KB, Khoza T, Wibmer CK, Moore PL, Morris L & Khati M (2012) UCLA1, a synthetic derivative of a gp120 RNA aptamer, inhibits entry of human immunodeficiency virus type 1 subtype C. *Journal of virology* 86(9):4989-4999.
- Musshoff F & Madea B (2006) Review of biologic matrices (urine, blood, hair) as indicators of recent or ongoing cannabis use. *Therapeutic drug monitoring* 28(2):155-163.
- Nutiu R & Li Y (2005) In vitro selection of structure-switching signaling aptamers. *Angewandte Chemie International Edition* 44(7):1061-1065.
- Pfeiffer F, Tolle F, Rosenthal M, Brändle GM, Ewers J & Mayer G (2018) Identification and characterization of nucleobase-modified aptamers by click-SELEX. *Nature protocols* 13(5):1153.
- Promega (2018) *PCR Cloning with Blue/White Selection and Easy Insert Excision*. <https://www.promega.ca/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360>
- Samyn N & Van Haeren C (2000) On-site testing of saliva and sweat with Drugwipe and determination of concentrations of drugs of abuse in saliva, plasma and urine of suspected users. *International journal of legal medicine* 113(3):150-154.
- Schou J, Prockop LD, Dahlström G & Rohde C (1977) Penetration of delta-9-tetrahydrocannabinol and 11-OH-delta-9-tetrahydrocannabinol through the Blood-brain Barrier. *Acta pharmacologica et toxicologica* 41(1):33-38.
- Securetec Detektions-Systeme AG (2014) *La gamme de produits DrugWipe®*. Neubiberg · Germany, https://www.hellopro.fr/documentation/pdf_prod/0/2/8/1343951_47082b4df51606663a5d491e8f0c038e.pdf
- Sefah K, Yang Z, Bradley KM, Hoshika S, Jiménez E, Zhang L, Zhu G, Shanker S, Yu F & Turek D (2014) In vitro selection with artificial expanded genetic information systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(4):1449-1454.
- Sharma P, Murthy P & Bharath MS (2012) Chemistry, metabolism, and toxicology of cannabis: clinical implications. *Iranian journal of psychiatry* 7(4):149.
- Sinha A, Gopinathan P, Chung Y-D, Lin H-Y, Li K-H, Ma H-P, Huang P-C, Shiesh S-C & Lee G-B (2018) An integrated microfluidic platform to perform uninterrupted SELEX cycles to screen affinity reagents specific to cardiovascular biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics* 122:104-112.
- Sinha J, Reyes SJ & Gallivan JP (2010) Reprogramming bacteria to seek and destroy an herbicide. *Nature chemical biology* 6(6):464.

- Smith-Kielland A, Skuterud B & Mørland J (1999) Urinary excretion of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabinoids in frequent and infrequent drug users. *Journal of analytical toxicology* 23(5):323-332.
- Song K-M, Lee S & Ban C (2012) Aptamers and their biological applications. *Sensors* 12(1):612-631.
- Song S, Wang L, Li J, Fan C & Zhao J (2008) Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27(2):108-117.
- Stojanovic MN, De Prada P & Landry DW (2001) Aptamer-based folding fluorescent sensor for cocaine. *Journal of the American Chemical Society* 123(21):4928-4931.
- Takenaka M, Okumura Y, Amino T, Miyachi Y, Ogino C & Kondo A (2017) DNA-duplex linker for AFM-SELEX of DNA aptamer against human serum albumin. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 27(4):954-957.
- Tétreault DN (2018) LÉGALISATION DU CANNABIS ENJEUX LÉGAUX ET ANALYTIQUES. *LE LABEXPERT*.
- Tuerk C & Gold L (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *science* 249(4968):505-510.
- Walter JG, Stahl F & Scheper T (2012) Aptamers as affinity ligands for downstream processing. *Engineering in Life Sciences* 12(5):496-506.
- Wilson J & Smith B (1999) Evaluation of detection techniques and laboratory proficiency in testing for drugs of abuse in urine: an external quality assessment scheme using clinically realistic urine samples. *Annals of clinical biochemistry* 36(5):592-600.
- Ye X, Shi H, He X, Wang K, He D, Yan La, Xu F, Lei Y, Tang J & Yu Y (2015) Iodide-responsive Cu–Au nanoparticle-based colorimetric platform for ultrasensitive detection of target cancer cells. *Analytical chemistry* 87(14):7141-7147.
- 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.
- Zhang Y, Lai BS & Juhas M (2019) Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Molecules* 24(5):941.
- Zhou J & Rossi J (2017) Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nature reviews Drug discovery* 16(3):181.

8 ANNEXES

Modèles mathématiques pour estimer le temps de la dernière consommation du cannabis

Un premier modèle a établi une relation entre le logarithme des concentrations sanguines de THC et le logarithme du temps de la dernière consommation (Eq 1). Une estimation de la pente et de l'interception a été interprétée par l'analyse de régression linéaire

$$\text{Eq 1 : } \mathbf{\text{Log T} = m \cdot \log [\text{THC}] + b}$$

Où T = temps passé après la dernière consommation du cannabis (heures), $m = -0,658$ (pente), [THC] = concentration sanguine de THC (ng/mL), et $b = 0,687$ (interception).

Le deuxième modèle trace une relation logarithmique entre le rapport des concentrations sanguines de de THCCOOH et THC et le temps écoulé de la dernière consommation (Eq 2).

$$\text{Eq 2 : } \mathbf{\text{Log T} = m * \log[\text{THCCOOH}]/[\text{THC}] + b}$$

Où T = temps passé après la dernière la consommation du cannabis (heures), $m = 0,576$ (pente), [THCCOOH]/[THC] = rapport sanguine THCCOOH/THC, et $b = -0,176$ (interception).