

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand Frappier

**Développement de biosenseurs pour la détection de virus d'intérêt
et mise en place de protocoles d'étude d'aptamères ADN.**

Par

Fatma Khalfaoui

Mémoire ou thèse présentée pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en Microbiologie Appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Philippe Constant
INRS-Institut Armand Frappier

Examineur externe

Mohamed Siaj
Département de Chimie
Université du Québec à Montréal

Directeur de recherche

Jonathan Perreault
INRS-Institut Armand Frappier

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce projet et plus spécialement :

Le Pr Jonathan Perreault, mon directeur de recherche et superviseur pour avoir cru en moi, guidée et motivée à mener à terme ce projet malgré les nombreux obstacles et challenges tout au long de ma maîtrise.

L'équipe du Pr Nicolas Doucet, pour m'avoir conseillée et orientée lors de plusieurs manipulations nécessitant leur expertise. Je les remercie pour leur temps et leur patience.

La Fondation Armand Frappier, pour m'avoir octroyée une bourse d'excellence et pour le soutien financier.

Les Pr Mohamed Siaj et Philippe Constant pour avoir accepté et pris la peine d'examiner ce mémoire et argumenter quant à la pertinence du travail.

Toute l'équipe du Groupe de Recherche en Microbiologie de l'Environnement pour leur soutien et disponibilité, professeurs et étudiants confondus.

DEDICACES

Je dédie ce travail à mes parents et ma sœur. Sans eux, mon expérience et ma nouvelle vie loin de mon pays n'auront jamais été possibles. Je leur suis redevable de tout ce que je deviens et essaye de devenir tous les jours. Ils m'auront appris que tant qu'on y croit, tout est possible. Et que la plus belle des possibilités est celle que l'on se crée soit même. En espérant avoir plus d'années encore pour les rendre fiers. En espérant leur rendre la pareille et plus encore.

Je le dédie aussi à ma moitié, celui qui m'accompagne depuis trois ans déjà dans mon voyage vers le meilleur de moi-même. Je le remercie pour sa patience, sa présence, d'avoir su avoir les mots pour apaiser les peurs, l'insécurité et les doutes qui auront jalonné mon périple vers la fin de cette maîtrise. J'espère que le voyage continuera encore un bout de temps, main dans la main, et toujours pour le meilleur.

Je remercie aussi toute l'équipe du laboratoire du Pr Jonathan Perreault et plus spécialement Roqaya Imane, Sabrina Najeh, Philippe Wong Yen, qui auront été plus que des collègues, mais des amis proches et partie intégrante de ma vie de tous les jours. Je remercie aussi les stagiaires G ael Montagne, Lainah Neptune et l'apprenti Jayson Mtanos pour avoir fait que cette maîtrise soit une belle expérience humaine pleine de bons moments et de fous rires.

Pour finir, je remercie mes deux sœurs de cœur, Marwa et Yosra, révélation de mon voyage outre atlantique, celles qui ont égayé mon quotidien et appris que la vie vaut la peine d'être vécue, malgré tout.

RÉSUMÉ

Les biosenseurs sont des outils de détection et de diagnostic présentant l'avantage d'être faciles et rapides d'utilisation et fiables. Afin de détecter des molécules d'intérêt, certains biosenseurs utilisent des acides nucléiques comme agent de reconnaissance couplés sur des fibres optiques qui traduisent l'évènement de reconnaissance en signal lumineux. Les aptamères sont des acides nucléiques synthétiques capables de lier spécifiquement des molécules, des bactéries, des virus etc. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, au développement d'un biosenseur utilisant des séquences d'ADN complémentaires à des génomes viraux comme sondes de reconnaissance. Il a été possible en effet d'obtenir un signal d'hybridation sur un modèle en silice représentatif de la fibre optique du biosenseurs sur lequel sont couplées les ADN sondes. Dans un second temps, nous avons cherché à développer des protocoles d'analyse de la liaison d'aptamères modèles à leurs ligands spécifiques. Plusieurs protocoles basés sur les modifications chimiques, la dialyse à l'équilibre et d'autres ont été testés. Des résultats prometteurs ont été obtenus lorsque la liaison de l'aptamère à son ligand est analysée par fluorométrie.

Biosensors are detection tools that present the advantage of being easy and rapid to use, and reliable. In order to detect molecules of interest, some biosensors use nucleic acids as recognition agents when coupled on fiber optics that translate the recognition event into light signal. Aptamers are synthetic nucleic acids capable of binding specifically molecules, bacteria, viruses, etc. Here we present, firstly, a biosensor development using DNA sequences that are complementary to viral genomes. It was indeed possible to detect DNA hybridization events on silica models. Secondly, we tried to developed protocols to analyze the binding event occurring between model aptamers and their specific ligands. Several protocols using chemical modifications, equilibrium dialysis and other approaches have been tested. Promising results were obtained when binding events were analyzed using fluorometry.

TABLES DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION	14
1.1. Les biosenseurs à fibre optique:	14
1.1.1 La fibre optique :	15
1.1.2. Avantages et exemples des biosenseur à fibre optique :	16
1.2. Développement de biosenseurs pour la détection de virus d'intérêt:	17
1.2.1. Le virus de l'immunodéficience humain VIH:.....	17
1.2.2. Le virus Ebola type Soudan :	20
1.3. Mise en place de protocoles pour évaluer l'interaction entre des aptamères d'ADN et leurs ligands :	23
1.3.1. La sélection <i>in vitro</i> des aptamères:	24
1.3.2. Caractéristiques des aptamères d'ADN:	25
1.3.3. Méthodes de caractérisation des aptamères candidats :	28
1.3.4. Applications des aptamères :.....	29
1.2.5. Modèles d'études :	30
2 . PROBLÉMATIQUES, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS:.....	34
2.1. Développement d'un biosenseur pour la détection de virus d'intérêt :	34
2.2. Mise en place de protocoles pour évaluer l'interaction entre des aptamères d'ADN et leurs ligands :	35
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES :.....	36
3.1. Développement d'un biosenseur pour la détection de virus d'intérêt :	36
3.1.1. Modèle de mise en place d'une plateforme de détection d'ARN viraux :	36
3.1.2. Modification de la surface de verre par silanisation :	36
3.2. Conception des oligonucléotides et synthèse <i>in vitro</i> de l'ARN viral :	38
3.2.1. Synthèse <i>in vitro</i> de l'ADN matrice par PCR d'assemblage	40
3.2.2. Transcription <i>in vitro</i> des fragments ARN de VIH-1 et SEBOV :	43
3.2.3. Conception des sondes de détection des ARN viraux et radiomarquage :	46
3.3. : Mise en place de protocoles pour évaluer l'interaction entre des aptamères d'ADN et leurs ligands :	49
3.3.1 : Analyse de la liaison par Shifted Reverse-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SR-PAGE) :	49
3.3.2. Analyse de la liaison par fluorométrie :	53
3.3.3. Analyse de la liaison par dialyse à l'équilibre :	56

3.3.4 : Analyse de la structure par méthylation à site spécifique par le DiméthylSulfate (DMS) :	59
4.RÉSULTATS:	62
4.1. Développement d'un biosenseur pour la détection de virus d'intérêt :	62
4.1.1. Test de détection d'une hybridation simple sur lame de verre :	62
4.1.2. Test de détection d'une hybridation en sandwich sur lame de verre :	64
4.2. : Mise en place de protocoles pour évaluer l'interaction entre des aptamères d'ADN et leurs ligands :	68
4.2.1 : Analyse de la liaison par Shifted Reverse-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SR-PAGE) :	68
4.2.2. Analyse de la liaison par fluorométrie :	71
4.2.3. Analyse de la liaison par dialyse à l'équilibre :	73
4.2.4 : Analyse de la structure par méthylation à site spécifique par le DiMéthylSulfate (DMS) :	77
5. DISCUSSION:.....	82
5.1. Développement d'un biosenseur pour la détection de virus d'intérêt :	82
5.2. Mise en place de protocoles pour évaluer l'interaction entre des aptamères d'ADN et leurs ligands :	86
5.2.1 : Analyse de la liaison par Shifted Reverse-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SR-PAGE) :	86
5.2.2. Analyse de la liaison par fluorométrie :	88
5.2.3. Analyse de la liaison par dialyse à l'équilibre :	91
5.2.4 : Analyse de la structure par méthylation à site spécifique par le DiméthylSulfate (DMS) :	92
6.CONCLUSION ET PERSPECTIVES:	94
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	96

LISTE DES TABLEAUX:

Tableau 1.1: Résumé des moyens de sensibilisation, diagnostic et lutte contre le VIH-1.

Tableau 1.2: Techniques de diagnostic en laboratoire du virus Ebola.

Tableau 1.3: Caractéristiques générales de l'ADN.

Tableau 1.4: Exemples de modifications chimiques de nucléotides pour les bibliothèques SELEX.

Tableau 1.5 : Exemples de méthodes de caractérisation des aptamères.

Tableau 3.1 : Protocole de silanisation des surfaces de verre.

Tableau 3.2 : Séquences des amorces pour la synthèse de la matrice ADN de la portion du gène *np* de SEBOV.

Tableau 3.3 : Séquences des amorces pour la synthèse de la matrice ADN de la portion du gène *gag* de VIH-1.

Tableau 3.4 : Réaction de transcription.

Tableau 3.5 : Composition d'un dPAGE 10%.

Tableau 3.6 : Séquences de capture et sondes utilisées pour la détection des ARN cibles des virus SEBOV et VIH-1.

Tableau 3.7 : Réaction de radiomarquage des sondes par la PNK.

Tableau 3.8 : Préparation d'un gel nPAGE 10%.

Tableau 3.9 : Réaction de migration d'aptamères pour SR-PAGE.

Tableau 3.10 : Étapes de démontage du gel suite à la première migration du SR-PAGE.

Tableau 3.11 : Composition des tampons de sélection des aptamères modèles.

Tableau 3.12 : Oligonucléotides compétiteurs du site de liaison de l'ATP sur l'aptamère.

Tableau 3.13 : Protocole de l'analyse structurale de l'aptamère d'ATP par méthylation différentielle.

Tableau 4.1 : Composition des spots d'essais d'hybridation en sandwich pour la détection de l'ARN du VIH-1.

Tableau 4.2 : Composition des spots d'essais d'hybridation en sandwich pour la détection d'une séquence représentative de l'ARN de SEBOV avec une sonde couplée à une AuNP.

Tableau 4.3 : Composition des solutions dans les chambres à dialyse.

Tableau 4.4 : Composition des solutions dans les chambres de dialyse pour les essais de compétition.

Tableau 4.5 : Description des échantillons utilisés pour l'optimisation du tampon de méthylation et de la concentration de DMS.

Tableau 4.6 : Description des échantillons utilisés pour l'analyse des profils de dégradation de l'aptamère ATP en présence ou absence de son ligand.

LISTE DES FIGURES:

Figure 1.1: Classification des biosenseurs selon l'élément de reconnaissance ou le type de signal transducteur.

Figure 1.2: Schématisation d'une fibre optique.

Figure 1.3: Structure du virus VIH-1.

Figure 1.4: Cycle de réplication du virus VIH-1.

Figure 1.5: Structure du virion *Ebolavirus*.

Figure 1.6: Schéma d'un protocole SELEX.

Figure 1.7 : Structure de l'adénosine triphosphate.

Figure 1.8 : Structure de la pochette de liaison de l'aptamère à l'ATP.

Figure 1.9 : Structure de l'aptamère de la L-arginine.

Figure 1.10 : Structure de l'aptamère de l'éthanolamine.

Figure 1.11 : Structure chimique de l'éthanolamine.

Figure 3.1. : Lame de microscope Fisherbrand.

Figure 3.2 : Fonctionnalisation de la surface du verre par silanisation.

Figure 3.3 : Conservation du gène *np* codant pour la nucléoprotéine du genre *Ebolavirus*.

Figure 3.4 : Séquence cible du gène *np* du SEBOV.

Figure 3.5 : Séquence cible du gène *gag* du virus VIH-1.

Figure 3.6 : Étapes de la PCR d'assemblage.

Figure 3.7 : Gel arrêté au bout de 24h de la première migration d'un SR-PAGE.

Figure 3.8 : Structure du SYBR-Safe.

Figure 3.9 : Répartition des échantillons sur les 3 premières lignes de la plaque 96 puits de fluorométrie pour la quantification de la K_D .

Figure 3.10 : Dispositif de dialyse « Dispo Equilibrium Dialyzer » de Harvard Apparatus (Massachusetts, USA).

Figure 3.11 : Schématisation de la migration du ligand radioactif dans une expérience de dialyse à l'équilibre.

Figure 3.12 : Composés utilisés pour la dégradation méthyl-dépendante de l'ADN.

Figure 4.1 : Essai de détection de l'hybridation simple entre deux séquences complémentaires.

Figure 4.2 : Disposition des essais d'hybridation sur une lame de verre pour la détection d'une hybridation simple.

Figure 4.3 : Essai d'hybridation simple de la séquence de capture et la sonde spécifiques de la détection du virus SEBOV sur lame de verre silanisée.

Figure 4.4 : Essai de détection de l'ARN cible par double hybridation.

Figure 4.5 : Disposition des essais d'hybridation sur une lame de verre pour la détection en sandwich de l'ARN du VIH-1.

Figure 4.6 : Essai d'hybridation en sandwich de séquences SEBOV avec des sondes radiomarquées couplées à des AuNP.

Figure 4.7 : Étapes d'un protocole SR-PAGE pour la sélection d'aptamères.

Figure 4.8 : Fractions d'aptamères ayant lié l'ATP dans un gel SR-PAGE.

Figure 4.9 : Comparaison des structures natives et liées de l'aptamère ATP et TPP avec deux gels SR-PAGE.

Figure 4.10 : Répartition des échantillons dans une plaque 96 puits pour l'essai de fluorométrie.

Figure 4.11 : Fluorescence due à l'intercalation du SYBR-Safe dans l'ADN.

Figure 4.12 : Détection par fluorescence SYBR-Safe de la liaison à leur ligand des 3 aptamères modèles .

Figure 4.13 : Saturation de l'aptamère ATP par son ligand après 24h par dialyse à l'équilibre.

Figure 4.14 : Saturation de l'aptamère ATP par des concentrations croissantes de son ligand.

Figure 4.15 : Dialyse à l'équilibre utilisant des oligonucléotides complémentaires au site de liaison de l'ATP sur l'aptamère.

Figure 4.16 : Profil de méthylation de l'aptamère ATP pour différents temps et différentes combinaisons de produits de DMS, AF et Pip.

Figure 4.17 : Profils de dégradation de l'aptamère ATP en présence ou absence d'un oligonucléotide compétiteur.

Figure 4.18 : Profils de dégradation différentielle de l'aptamère ATP en présence et absence de son ligand.

Figure 5.1 : Schéma des réactions de couplage possibles d'ADN sur une surface de verre.

Figure 5.2 : Moyenne des pics de la diffusion spectrale d'une lumière verte à travers des spots d'agrégats de AuNP fonctionnalisées avec des ADN complémentaires.

Figure 5.3 : Décroissance de la fluorescence entre l'état lié et non lié de l'aptamère ATP en présence de chromophores.

Figure 5.4 : Schématisation du modèle de détection des G-quadruplex par signal fluorescent différentiel de l'intercalation du SGI.

Figure 5.5 : Analyse thermofluorométrique de la liaison de l'aptamère à PDGF en utilisant le SYBR Green comme agent intercalant.

LISTE DES ABRÉVIATIONS:

³²P : isotope 32 de phosphore radioactif

A : Adénine

ADNdb: ADN double brin

ADNsb: ADN simple brin

AF : Acide Formique

APS : Ammonium PerSulfate

ARN+: ARN de polarité positive

ARNsb : ARN simple brin

ATP : Adénosine TriPhosphate

AuNP: NanoParticules d'or

BBP: Bleu de BromoPhénol

C: Cytosine

COOH : carboxyle

CPM : comptes par minute

DMS : DiméthylSulfate

dPAGE : Gel PolyAcrylamide dénaturant

EDC : 1-ethyl-3(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide

EtOH : éthanol

ExoIII : Exonucléase III

G: Guanine

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

H₂SO₄ : acide sulfurique

L-Arg : L-Arginine

LPGF : Long Period Grating Fiber

Melm: 1-méthylimidazole

NaOAc : acétate de sodium

NH₂ : amine

NHSS : N-hydroxysulfosuccinimide

nPAGE : Gel PolyAcrylamide natif

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Pb : Paires de Bases

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor, ou Facteur de croissance dérivé des plaquettes

Pip : Pipéridine
PM : Poids Moléculaire
PNK : Polynucléotide Kinase
Rpm : rotations par minute
SEBOV: Virus EBOLA type Soudan
SELEX : Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment
SGI : SYBR Green I
SIDA: Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SR-PAGE : Shifted-Reverse PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
T : Thymine
TBMg : Tris-Borate Magnésium
TEMED : TEtraMéthylEthylèneDiamine
Thi : Thiamine
TIR : Total Internal Refraction
Tm° : Température de fusion
TMP : Thiamine MonoPhosphate
TPP : Thiamine PyroPhosphate
μCi : microCurie
UFP : Unité formant des plaques
VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VIH-1 : Virus de l'Immunodéficience Humaine 1
W : Watts
XC: bleu de Xylène Cyanole

1. INTRODUCTION

1.1. Les biosenseurs à fibre optique:

Les biosenseurs sont des outils de détection qui se basent sur un évènement de reconnaissance d'un élément biologique et traduisent ce phénomène en signal mesurable. Ils sont composés d'un senseur (élément de reconnaissance) et d'un transducteur électrique ou optique (S. Song *et al.*, 2006).

La définition officielle selon l'Union Internationale de la Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) est qu'un biosenseur est "un dispositif qui utilise des réactions biochimiques spécifiques par le biais d'enzymes isolées, systèmes immunologiques, tissus, organelles ou cellules entières pour détecter des composés chimiques habituellement par des signaux électriques, thermiques ou optiques."

L'attrait d'un biosenseur est essentiellement relié à deux critères: la spécificité et la sensibilité. Le premier critère est dépendant de la stabilité de la liaison entre la molécule d'intérêt et l'élément de reconnaissance. L'affinité (traduite par la constante de dissociation K_D) est la caractéristique principale décisive pour la sélection de cet élément. Le critère de sensibilité quant à lui est dépendant de l'élément de reconnaissance et de l'outil de transduction (Leung *et al.*, 2007).

Il est possible de classer les types de biosenseurs selon deux approches: en se basant sur le type d'élément de reconnaissance ou sur le type signal transducteur. La figure 1.1 résume les deux classifications.

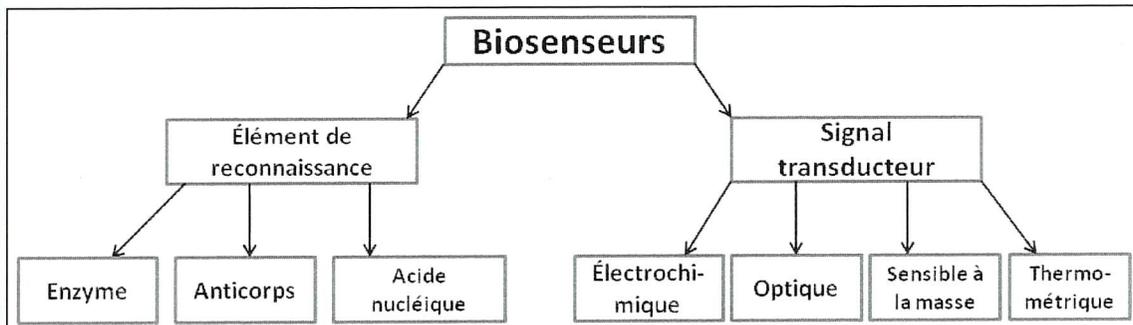


Figure 1.1: Classification des biosenseurs selon l'élément de reconnaissance ou le type de signal transducteur. (Adapté de (Marazuela *et al.*, 2002)

Dans la suite des travaux, nous nous intéresserons essentiellement aux biosenseurs utilisant l'ADN comme élément de reconnaissance et la fibre optique comme outil de

transduction du signal. Pour ce faire, nous utiliserons les fibres optiques pour détecter des acides nucléiques viraux dans un premier temps. Dans un second temps, nous nous intéresserons aux aptamères ADN comme éléments de reconnaissance et essaierons de développer des protocoles d'évaluation de l'interaction entre les aptamères et les molécules d'intérêt à détecter.

1.1.1 La fibre optique :

Une fibre optique est un dispositif en silice formé d'un cœur, d'une gaine optique et d'un revêtement de protection. Cet outil est utilisé aussi bien dans le domaine des télécommunication, la fabrication d'éclairages que pour le développement d'outils de détection en biologie.

Le cœur et la gaine possèdent des indices de réfractifs (n_1 et n_2 respectivement). Vu que le cœur est couvert de Germanium, son indice de réfraction est légèrement plus élevé que celui de la gaine. Ceci force le faisceau laser ou la lumière à se réfracter de manière totale interne (TIR pour Total Internal Refraction) (Leung *et al.*, 2007). Lorsque la gaine est fonctionnalisée avec des molécules de reconnaissance qui se lient à leur cible, l'angle d'incidence de la lumière change et il y a formation d'une onde évanescente au site de liaison.

L'onde évanescente correspond à la perte d'intensité de la lumière produite au site de la liaison de la molécule de reconnaissance à une distance d_p de la gaine. La figure 1.2 montre schématiquement les paramètres pris en compte lors de la propagation d'une lumière dans une fibre optique.

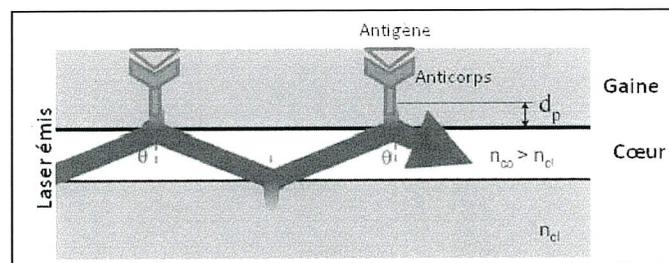


Figure 1.2: Schématisation d'une fibre optique. La lumière traverse le cœur de la fibre avec une longueur d'onde précise et génère des angles d'incidences au point de contact avec la gaine fonctionnalisée. Lorsque le ligand lie l'anticorps, l'indice de réfraction n_{cl} de la gaine change et génère une onde évanescente. Légende: n_{co} : indice de réfraction du cœur, n_{cl} : indice de réfraction de la gaine, d_p : distance de propagation de la lumière à travers la gaine, θ : angle d'incidence (modifié de (Leung *et al.*, 2007)).

Dans le cas d'un biosenseur, il est possible de fonctionnaliser la surface du revêtement et d'y attacher des molécules de reconnaissance, par exemple un anticorps. L'outil est par la suite mis en contact avec une solution biologique contenant l'antigène spécifique à l'anticorps. La liaison de ces derniers provoquera un changement de l'indice de réfraction du cœur.

Pour nos travaux, nous utilisons la fibre optique à longue période de diffraction (LPGF) faite à partir de la fibre Corning SMF-28®. Elle est formée d'un cœur et d'une gaine en silice. Le cœur est d'une largeur de 8,2µm et la gaine de 125µm. Elle est fonctionnelle à des températures allant de -60°C à +85°C (Corning, 2014). Les LPGF présentent des perturbations à la surface du cœur à intervalle régulier (100µm à 1mm de distance). L'indice de réfraction du cœur est modifié à ces sites spécifiques appelés « modulations périodiques ». Lorsqu'un laser est émis dans une LPGF, le spectre transmis présente des bandes atténuées correspondant à des longueurs d'ondes modifiées suite à la diffraction différentielle sur les zones du cœur où l'indice de réfraction est modifié (James *et al.*, 2003).

1.1.2. Avantages et exemples des biosenseur à fibre optique :

L'utilisation de biosenseurs à fibre optique présente plusieurs avantages. L'un des plus importants est l'inertie chimique de la fibre qui la rend utilisable dans différentes solutions et milieux à analyser. Les fibres optiques sont insensibles aux interférences électromagnétiques de leur environnement et présentent une faible perte de signal tout au long de la distance de transmission (Wang *et al.*, 2009).

Plusieurs biosenseurs utilisant l'ADN comme molécule de reconnaissance ont été développées. Par exemple, l'équipe de Kleinjung F., *et al* (1997) a mis en place un premier senseur à fluorescence avec une fibre optique fonctionnalisée avec des oligomères d'ADN couplés à des molécules fluorescente comme le PicoGreen. Une détection allant aussi bas que 3,2 attomoles des séquences complémentaires à l'ADN fonctionnalisé sur la fibre a été reportée. Cet outil a été appelé genosensor (Kleinjung *et al.*, 1997). Plus tard en 2003, Almadidy A., *et al* ont publié des travaux explicitant l'utilisation d'une fibre optique fonctionnalisée avec des séquences d'ADN simple brin (ADNsb) de 25 nucléotides capables de s'hybrider spécifiquement sur une région complémentaire de 25 nucléotides sur le gène *lacZ* de la bactérie *Escherichia coli*. Avec ce travail, ils ont prouvé la possibilité d'utiliser un biosenseur à

fibre optique à ADN pour la détection de séquences spécifiques à la présence de bactéries dans des échantillons donnés (Almadidy *et al.*, 2003).

1.2. Développement de biosenseurs pour la détection de virus d'intérêt:

Les virus sont des parasites intracellulaires possédant un acide nucléique et pouvant assurer leur propre réplication en détournant la machinerie cellulaire hôte. Ils ne sont pas considérés comme des cellules (Roossinck, 2011). Les virus représentent une grande menace pour la santé humaine. Par exemple, selon les rapports de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) de 2014, 1.2 millions de personnes sont mortes des suites d'une infection au virus VIH (Virus de l'Immunodéficience Humain). Les épisodes épidémiques dus au virus du genre Ebola sont quant à eux reportés avec des taux de mortalités souvent supérieurs à 40% depuis les années 1970 (<http://www.who.int>). La détection des virus est possible grâce aux biosenseurs à fibre optique. Basée sur le principe de complémentarité des acides nucléiques, il est possible de détecter les génomes viraux grâce à des séquences couplées sur la fibre optique. Dans ce mémoire, nous nous intéressons à deux virus modèles, choisis pour leur impact sur la santé mondiale, mais aussi parce qu'ils possèdent des génomes à ARN simple brin (ARNsb). Les virus VIH-1 et Ebola choisis sont décrits dans les sections qui suivent.

1.2.1. Le virus de l'immunodéficience humain VIH:

Le virus VIH est un virus enveloppé à ARN rétrotranscrit responsable du SIDA (Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise). Ce virus appartient à la famille des *Retroviridae*, genre des *Lentivirus* (<http://www.ictvonline.org>). VIH-1 est l'espèce la plus commune de ce virus et nous nous intéressons à celle-ci dans le reste du travail. La figure 1.3 montre la structure du virus VIH-1.

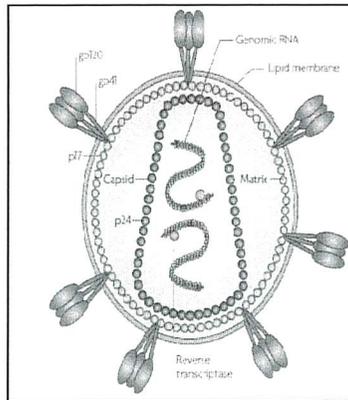


Figure 1.3: Structure du virus VIH-1. Les composants principaux d'un virus VIH-1 sont exposés. (Adapté de(Karlsson Hedestam *et al.*, 2008).

Le génome du VIH-1 est un ARNs_b, d'environ 9kb et de polarité positive (ARN⁺). Lors de son introduction dans la cellule hôte, il est directement rétrotranscrit en ADN double brin (ADN_{db}) par la transcriptase inverse (RT) du virus codée par le gène *pol*. L'ADN proviral produit est intégré au génome de la cellule hôte et transcrit sa machinerie pour donner le nouvel ARN(+). Cet ARN est encapsidé dans les nouvelles particules virales à libérer (Ahluqist, 2006, Karlsson Hedestam *et al.*, 2008). La figure 1.4 illustre la réplication du génome du VIH-1 lors de l'infection.

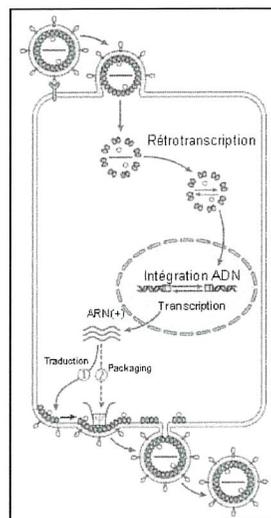


Figure 1.4: Cycle de réplication du virus VIH-1. (Du haut vers le bas) Le virus s'attache à la cellule hôte et l'enveloppe fusionne avec la membrane cellulaire. Le génome viral est libéré et la RT virale rétrotranscrit le génome viral pour l'introduire dans le génome hôte. Une transcription permet le recouvrement de l'ARN + viral qui sera traduit et encapsidé de nouveau dans les virions. Les virions matures sont libérés (Adapté de(Ahluqist, 2006).

Les infections par VIH-1 provoquent le SIDA chez les êtres humains. L'infection passe par trois stades cliniques. Le stade primaire présente des symptômes fortement assimilables à ceux de l'infection par le virus de la grippe. Il se manifeste par des fièvres, des sueurs ainsi qu'une intense fatigue. Ce stade peut durer de quelques jours à plusieurs semaines. Pendant la deuxième phase de latence, le virus s'exprime et se multiplie dans l'organisme de l'hôte mais très faiblement. Cette phase peut durer jusqu'à une décennie chez certains patients et est asymptomatique. Le dernier stade présente une expression maximale du génome viral. Les systèmes immunitaire et lymphatique sont alors diminués considérablement et plusieurs infections opportunistes se mettent en place telles que la pneumonie (<http://www.aids.gov>).

En 2014, l'OMS a recensé un total de 36.9 millions d'individus atteints du virus du SIDA dont 1.9 millions ayant nouvellement commencé une thérapie. Dans la même année, 1.2 millions de personnes sont mortes des suites d'une infection au virus du SIDA. Ce virus est considéré comme pandémique (Sharp *et al.*, 2011).

Depuis sa découverte en 1981 (OMS, 2003) et sa rapide expansion, l'OMS a mis en œuvre plusieurs moyens de lutte contre le virus du SIDA à différents niveaux. Le tableau 1.1 résume les approches de sensibilisation, moyens de diagnostic et prévention et lutte contre la transmission du virus du SIDA.

Tableau 1.1: Résumé des moyens de sensibilisation, diagnostic et lutte contre le VIH-1.

Niveau	Description
Sensibilisation	<ul style="list-style-type: none"> - Le VIH-1 est un virus transmissible par voie sexuelle, de mère à enfants, et par contact avec des sécrétions/sang contaminés par le virus. - L'OMS travaille sur la sensibilisation des personnes sur l'importance des rapports protégés, le dépistage précoce, l'utilisation de seringues à usage unique, etc. (OMS, 2003).
Dépistage	<ul style="list-style-type: none"> - Dépistage immunologique par des enzymes pour différents antigènes du VIH-1 (p24, protéine de la capsid étant le plus utilisé). - Westernblot pour la détection des protéines virales en utilisant des anticorps spécifiques présents dans le sérum des patients. - PCR utilisant des amorces hautement spécifiques pour l'ADN viral pour confirmer la présence ou l'absence du virus et le génotypage des patients durant les thérapies pour détecter les éventuelles résistances induites (Fearon M, 2005).
Lutte et thérapies	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de cure disponible à nos jours. - Thérapies mises sur le marché pour retarder la réplication du virus et limiter la transmission - Thérapie anti rétrovirale: près de 25 molécules sont utilisées pour réduire la rétrotranscription de l'ARN viral et diminuer la charge virale dans les partie génitales et le sang des personnes atteintes. Limitation de la transmission possible.

1.2.2. Le virus Ebola type Soudan :

Le virus Ebola appartient à la famille des *Filoviridae*, du genre Ebolavirus. A nos jours, cinq espèces sont recensées dans ce genre dont quatre infectant l'homme (Sudan ebolavirus (SEBOV), Zaire ebolavirus, Tai forest ebolavirus et Bundibugyo ebolavirus). C'est un virus enveloppé, à ARNs linéaire de polarité négative et non segmenté (Goel *et al.*, 2015). Sa structure est détaillée dans la figure 1.5. L'intérêt pour ce virus provient de l'importance des épisodes épidémiques dont il est

responsable (le premier étant en 1976). L'absence de remède et le haut taux de mortalité de ce virus ont mené l'OMS à le considérer à plusieurs reprises comme une urgence de santé publique d'envergure internationale.

La figure 1.5 présente la structure du virus Ebola.

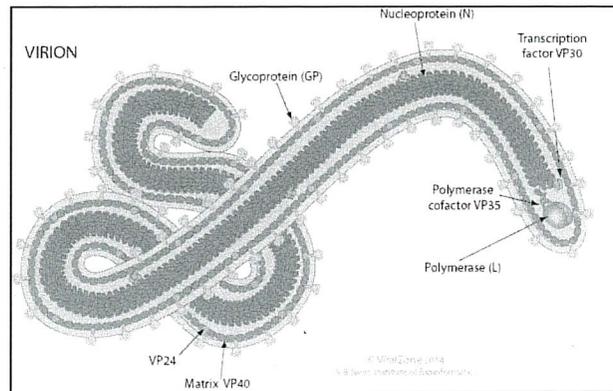


Figure1.5: Structure du virion *Ebolavirus*. (<http://viralzone.expasy.org/>).

Ici nous nous intéressons à la souche SEBOV comme exemple d'étude. Elle est la cause de la plus grande vague épidémique causée par les virus Ebola enregistrée en 2001 en Ouganda. Elle a causé 425 cas d'infections avec un taux de mortalité de 53%. Cette souche est la deuxième plus mortelle du genre (McElroy *et al.*, 2014).

Le génome de la souche SEBOV est d'environ 19kb. Il code pour une ARN polymérase dépendante de l'ARN viral. Cette enzyme transcrit l'ARN viral en sept ARN messagers monocystroniques (Muhlberger, 2007). Le cycle de réplication du virus SEBOV suit trois étapes principales. Dans un premier temps, le virus s'introduit dans les cellules hôtes. Préférentiellement, il infecte les macrophages et les cellules dendritiques. Son introduction est assimilable à une macropinocytose (entrée de particules non spécifiques d'environ 1µm dans la cellule). La deuxième étape est la transcription du génome viral par l'ARN polymérase ARN dépendante: l'ARN polymérase virale transcrit l'ARN en commençant en 3' du génome et la transcription est réinitialisée à chaque région intergénique. De ce fait, le premier gène transcrit est toujours plus abondant que le dernier. Finalement, les protéines virales sont traduites et les virions sont assemblés et libérés sous forme de nouvelles particules virales (Muhlberger, 2007).

Les virus du genre Ebola sont généralement caractérisés par un haut taux de mortalité et une facilité de transmission. La transmission se fait en entrant en contact avec des cadavres humains ou des fluides corporels infectés en étant non protégé. Aussi l'ingestion de viandes provenant d'animaux chassés infectés n'ayant pas été bien cuites peut conduire à une infection. Les infections nosocomiales sont aussi recensées (par seringues contaminées).

Les symptômes cliniques sont non spécifiques aux premiers jours de l'infection et consistent en une fièvre et des maux de tête, des diarrhées et un état de fatigue générale. Dans des stades plus avancés de l'infection, des hémorragies internes et externes apparaissent ainsi que des atteintes du foie et des reins (W. B. Liu *et al.*, 2015).

L'espèce SEBOV est à l'origine de l'une des premières épidémies survenue en 1976 au Soudan du sud suivie d'une autre vague en 1979 dans le même pays. Les taux de mortalité ont dépassé les 50% (W. B. Liu *et al.*, 2015). Plus récemment, en 2012, l'espèce était à l'origine d'une épidémie en Ouganda avec un taux de mortalité de 71% (WHO Technical Report Series, 2012).

Le virus SEBOV étant responsable d'épidémies d'envergure internationale, l'OMS recommande la mise en quarantaine de tout individu montrant des symptômes d'infection ou confirmé comme infecté. La prévention est en ligne de mire des actions de l'OMS et des gouvernements des pays concernés par ces épidémies. Les centres de contrôle et prévention des maladies responsables de la gestion des sites touchés par les épidémies recommandent de ce fait d'augmenter les mesures d'hygiène, éviter le contact avec les individus ou items d'individus infectés ainsi que d'avoir recours aux installations publiques des pays touchés par les épidémies. En 2015, des laboratoires affiliés à l'OMS sont passés en phase III de l'étude clinique d'un vaccin potentiel contre le virus Ebola. Le vaccin rVSV-ZEBOV a été inoculé sur des groupes d'individus à exposition maximale mais non infectés (4123) et aussi sur des individus déjà infectés par le virus (3528). La réponse des différents groupes suite à la vaccination a été jugée élevée et le vaccin efficace, basé sur des analyses statistiques (Henao-Restrepo *et al.*, 2015). Beaucoup de laboratoires se sont intéressés à la mise en place de moyens de dépistage précoce des infections au

virus SEBOV. Le tableau 1.2 résume les techniques d'usage pour le diagnostic des atteintes virales.

Tableau 1.2: Techniques de diagnostic en laboratoire du virus Ebola (Adapté de (Kaushik *et al.*, 2016).

Méthode	Test	Échantillons	Remarques
Quantitatives	PCR	Sang, sérum, tissu	Quantification de l'ARN viral
	Nano Codes-barres fluorescents d'ADN	Tissus sanguins	Limite de 620 attomoles de particules pathogènes
Qualitatives	ELISA	Sang, tissu, sérum	Rapide et sensible, deux variantes (ELISA antigène, ELISA standard),
	Microscopie électronique	Sang, tissus	Sensibilité limitée, nécessite un équipement de pointe
	Western Blot	Sérum	Spécifique aux protéines

En plus de la mise en place de techniques de dépistage du virus en laboratoire, certaines équipes se sont intéressées au développement de biosenseurs pour la détection précoce de la présence du virus dans les fluides biologiques. Par exemple, l'équipe de Yanik A.A *et al* (2010) a mis en place un biosenseur optique utilisant des anticorps dirigés contre la glycoprotéine d'un pseudovirus Ebola produit à partir du VSV (virus de la stromatite vésiculaire). Les auteurs appuient leur travail par un essai du biosenseur sur un échantillon de virus complet (sans lyse cellulaire ou extraction de protéines virales). Ils observent des shifts de résonance à des concentrations de 10^6 UFP/mL (Yanik *et al.*, 2010).

1.3. Mise en place de protocoles pour évaluer l'interaction entre des aptamères d'ADN et leurs ligands :

L'ADN ou Acide DésoxyriboNucléique est le support de l'information génétique. Il est composé d'une suite de nucléotides (A: adénine, T:thymine, G:guanine, C:cytosine). Il code, ou non, de l'ARN messager (Ussery, 2002). Le tableau 1.3 cite les plus importantes caractéristiques de l'ADN.

Tableau 1.3: Caractéristiques générales de l'ADN (Adapté de (Ussery, 2002).

Caractéristiques	Détails
Physicochimiques	-Charge négative. -Les bases s'apparient A-T et G-C.
Flexibilité	- Conformation en simple brin (sb) ou double (db) ou triple brin (tb). La conformation double brin donne une structure tertiaire en double hélice. La conformation triple brin donne une structure tertiaire en triple hélice -Selon l'alternance des bases, l'ADN peut adopter différentes hélices: hélice-A, hélice-B ou hélice-Z. - Les ADNsb peuvent engendrer des repliements et des structures complexes (tiges et boucles (Broude, 2002), jonctions à quatre voies (Eichman <i>et al.</i> , 2002), etc.)

Les aptamères d'ADN sont de courtes séquences d'ADN ayant la capacité de lier spécifiquement et avec une haute affinité des molécules données. Cette catégorie d'ADN a été découverte et développée grâce au développement de la technique SELEX (K. M. Song *et al.*, 2012). La capacité des aptamères à lier spécifiquement des molécules uniques en a fait des candidats de choix pour le développement des biosenseurs.

1.3.1. La sélection *in vitro* des aptamères:

La sélection d'aptamères d'ADN ou d'ARN se fait grâce à la technique SELEX (Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment). Cette technique simule une évolution *in vitro* de séquences nucléotidiques aléatoires jusqu'à l'obtention d'un groupe de séquences spécifiques à un ligand donné (K. M. Song *et al.*, 2012). Pour la sélection d'un aptamère contre un ligand donné, une librairie d'oligonucléotides aléatoires est utilisée. Chaque séquence de cette librairie est composée d'une région aléatoire de n nucléotides (où $10 < n < 100$) flanquée de deux régions à séquences connues. Ces deux régions servent à l'amplification par PCR des séquences sélectionnées à chaque cycle. Une librairie typique de SELEX contient entre 10^{12} - 10^{17} séquences.

Le protocole SELEX se fait en quatre étapes principales. Premièrement, la librairie est générée aléatoirement et est flanquée en 5' et 3' par des séquences connues. Deuxièmement, les séquences sont mises en contact avec le ligand spécifique et sont incubées. Certaines séquences peuvent se lier au ligand d'intérêt. Le nombre de séquences ayant cette capacité est généralement considérablement inférieur à celui des séquences non spécifiques. Troisièmement, Les fragments de la librairie n'ayant pas lié le ligand sont élués et enfin les fragments spécifiques au ligand sont séparés de leur cible et amplifiés par PCR. Les séquences amplifiées sont par la suite incubées avec le ligand pour affiner la sélection.

Les étapes SELEX sont répétées de manière cyclique. Ainsi un protocole SELEX type comporte entre 10 et 15 cycle. Cette procédure permet de sélectionner des aptamères de plus en plus affins pour le ligand. En résultante, un pool d'aptamères candidats est sélectionné et caractérisé. La figure 1.6 résume les étapes du protocole SELEX.

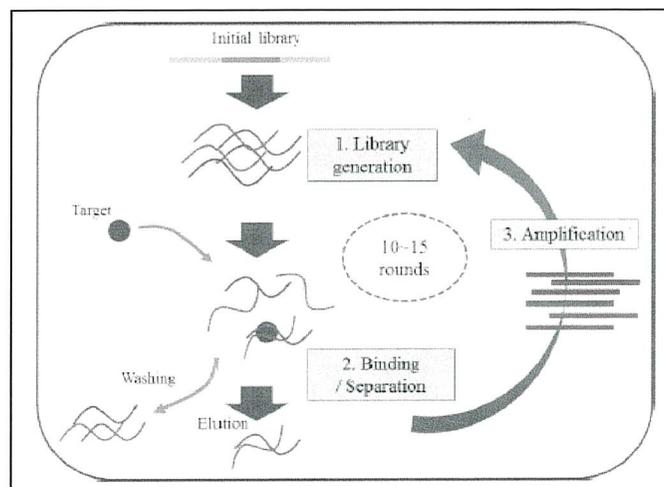


Figure 1.6: Schéma d'un protocole SELEX. (De haut en bas) La librairie SELEX est mise en contact avec le ligand d'intérêt (rond rouge). Les séquences ne s'étant pas liées au ligand sont lavées et celles liées sont éluées de leur ligand. Ces séquences sont amplifiées par PCR en utilisant des amorces complémentaires aux régions connues et la procédure est répétée de manière cyclique (K. M. Song *et al.*, 2012).

1.3.2. Caractéristiques des aptamères d'ADN:

Les aptamères d'ADN ont la capacité de lier spécifiquement une molécule donnée avec une grande capacité de discrimination entre deux molécules homologues. Ils

sont aussi dotés d'une affinité caractérisée par une constante de dissociation K_D qui idéalement tend à être la plus faible possible pour les meilleurs aptamères candidats.

Les aptamères ADN ont aussi de grands avantages qui les rendent compétitifs face aux anticorps tels que:

- La production: relativement facile par rapport à celle des anticorps. Les anticorps nécessitent l'immunogénéisation d'animaux contre une molécule, un virus ou une bactérie d'intérêt puis la purification des anticorps produits (J. K. Liu, 2014). Grâce à la technique SELEX, le développement d'aptamères contre une molécule spécifique nécessite seulement l'utilisation d'une librairie de séquences d'ADN et des amplifications PCR. Contrairement au développement des anticorps, la SELEX ne nécessite donc pas l'utilisation d'un système vivant pour la production. De plus, une fois l'aptamère sélectionné, son utilisation est facilitée puisqu'il peut être commandé directement chez un fournisseur d'oligonucléotides.
- La faible immunogénicité: le système immunitaire humain ne synthétise pas d'anticorps contre les aptamères (Keefe *et al.*, 2010). Ceci représente un grand avantage quand la thérapie par les aptamères est envisagée. Par exemple, en décembre 2004 la FDA (Food and Drugs Agency, USA) a autorisé la commercialisation d'une drogue-aptamère anti VEGF (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire). Ce facteur étant impliqué dans l'angiogénèse des tumeurs, un aptamère ARN a été sélectionné pour contrer ce facteur et remplacer les anticorps jusque là utilisés. Cette drogue est commercialisée sous le nom de Macugen® (pegaptinib sodium) (Ng *et al.*, 2006).
- La grande stabilité: Les aptamères ADN utilisés pour le développement des biosenseurs sont d'un grand attrait puisque leur stabilité permet la conservation de l'outil à température ambiante. Mais quand ils sont utilisés dans des systèmes vivants, ils sont sujets aux attaques des nucléases. De plus leur demi-vie est relativement courte. Par exemple, la demi-vie de l'aptamère ADN anti thrombine a été estimée à 108 secondes ± 14 secondes dans le sang du singe (Griffin *et al.*, 1993). Néanmoins il est possible d'utiliser des nucléotides modifiés lors de la synthèse des librairies SELEX. Ces

nucléotides modifiés sont résistants aux nucléases. Le tableau 1.4 présente quelques exemples de modifications possibles lors de la préparation de bibliothèques SELEX.

Tableau 1.4: Exemples de modifications chimiques de nucléotides pour les bibliothèques SELEX (Adapté de (Keefe *et al.*, 2008).

Type de modification	Détails	Référence
2'-amino pyrimidines	<ul style="list-style-type: none"> - Modification par NH₂ en 2' de la pyrimidine - Amplification de la résistance aux attaques des nucléases. -Synthèse en phase solide difficile et peu effective. 	(Proske <i>et al.</i> , 2002)
2'-fluoro pyrimidines	<ul style="list-style-type: none"> - Modification par un fluore en 2' de la pyrimidine -Nécessite une T7 polymérase mutante Y639F pour la transcription des ARN du SELEX. -Synthèse ne nécessitant pas d'étapes de protection/déprotection. -L'ARN est peu avantageux pour le développement de biosenseurs puisque instable. 	(Judy Ruckman <i>et al.</i> , 1998, Ruckman <i>et al.</i> , 1998)
2'-O-methylnucleotides	<ul style="list-style-type: none"> -Modification post SELEX des purines par méthylation -2'OMe nucléosides présents à l'état naturel -Les polymérases naturelles ne tolèrent pas les substrats méthylés. Aptamères plus résistants aux attaques de nucléases naturelles. -Peu onéreux 	(Burmeister <i>et al.</i> , 2005)

1.3.3. Méthodes de caractérisation des aptamères candidats :

Après la sélection *in vitro*, le pool d'aptamères candidats obtenus est séquencé. Généralement, plusieurs aptamères sont retenus à la fin d'un SELEX. Par la suite, une série d'analyses peut être effectuée pour couvrir deux aspects de la caractérisation qui sont :

- La structure de l'aptamère : essentiellement focalisée sur la structure de la poche de liaison de l'aptamère, la longueur minimale de la séquence ainsi que la conformation de l'aptamère en présence de son ligand.
- La cinétique de la liaison et conditions de l'équilibre : pour étudier l'évènement de liaison et analyser ses conditions optimales. Cette étape peut aussi renseigner sur le nombre de ligands capturés par l'aptamère, la K_D ainsi que les constantes thermodynamiques régissant la liaison.

Le tableau 1.5 résume les différents aspects de la caractérisation ainsi que les méthodes utilisées.

Tableau 1.5 : Exemples de méthodes de caractérisation des aptamères.

Caractérisation Structurale	Définition de la longueur minimale fonctionnelle de l'aptamère	<ul style="list-style-type: none"> • Probing enzymatique : en utilisant des endonucléases ou une hydrolyse alcaline des aptamères radiomarqués, il est possible de définir les fragments ayant gardé l'activité de liaison et ainsi définir un motif minimal pour l'aptamère (Sun <i>et al.</i>, 2010).
	Étude structurale du complexe aptamère-ligand	<ul style="list-style-type: none"> • Cristallographie par rayons X (Ruigrok <i>et al.</i>, 2012) • Résonance Magnétique Nucléaire (NMR)(Lin <i>et al.</i>, 1997) • Probing enzymatique et chimique : selon la présence ou l'absence du ligand, la dégradation des aptamères par une enzyme ou une molécule chimique à des sites spécifiques est différentes. Ceci résulte de l'exposition dépendante de la conformation de la séquences selon la liaison ou non au ligand (Sun <i>et al.</i>, 2010).
Caractérisation de la liaison	Caractérisation thermodynamique	<ul style="list-style-type: none"> • Titration calorimétrique isotherme (Muller <i>et al.</i>, 2006)
	Cinétique de la liaison	<ul style="list-style-type: none"> • Transfert d'énergie par résonance de fluorescence sur une molécule unique (SM-FRET) (Hallera, 2013)

1.3.4. Applications des aptamères :

Les aptamères ADN ou ARN possèdent des caractéristiques qui les rendent attrayants pour différents domaines d'applications. Leur capacité à lier spécifiquement des molécules avec leur facilité relative de synthèse par rapport à

d'autres molécules concurrentes (ex. les anticorps) les rendent compétitifs pour plusieurs domaines d'application.

- Les biosenseurs : plusieurs biosenseurs ont été développés en utilisant les aptamères ADN comme éléments de reconnaissances. Par exemple, une détection de la cocaïne et une quantification par signal fluorescent est possible grâce à un aptamère ADN spécifique. En présence de la cocaïne, l'aptamère adopte une conformation en jonction à trois voies et éloigne un fluorophore et un quencher couplés sur les extrémités de l'aptamère. Lorsque ces deux molécules sont en proximité, elles émettent un signal fluorescent. Ce signal est perdu lorsqu'elles sont espacées. Cette perte de signal correspond donc à la liaison de la cocaïne à l'aptamère (Stojanovic *et al.*, 2001). Dans un autre exemple de biosenseurs, il est possible de développer des aptamères pour la détection de bactéries d'origine alimentaire telles que *Salmonella* ou *Vibrio*. Ces aptamères serviraient à la prévention d'infections liées aux produits carnés et laitiers (Hong *et al.*, 2015).
- Découverte de nouveaux biomarqueurs pour le cancer : Plusieurs travaux ont démontré l'utilisation des aptamères dans le développement de biomarqueurs. L'approche Cell-SELEX utilise des lignées cellulaires tumorales comme cible de sélection pour les bibliothèques d'aptamères. En parallèle avec des sélections négatives, la procédure résulte en un pool d'aptamères candidats hautement spécifiques des cellules tumorales caractéristiques d'un type de cancer donné (Shangguan *et al.*, 2006).
- Bioimagerie : Lee Y.K *et al.*, (2010) ont développé un protocole de détection de cellules tumorales en utilisant un aptamère ciblant spécifiquement la nucléoline transmembranaire des cellules tumorales. Cet aptamère était modifié par un fluorophore Cy3 (Lee *et al.*, 2010).

1.2.5. Modèles d'études :

Pour les travaux présentés ici, trois aptamères d'ADN largement caractérisés ont été choisis pour la mise en place de nouveaux protocoles d'études. Ils ont été choisis pour leur capacité à lier chacun une petite molécule.

- Aptamère liant l'adénosine triphosphate ATP :

L'aptamère ADN de l'ATP a été sélectionné par SELEX en 1995 par l'équipe de Huizenga et Szostak (Szostak *et al.*, 1995). L'affinité de l'aptamère à l'ATP est définie par une K_D de $10\mu\text{M}$ (Razvan Nutiu and Yingfu Li, 2003, Szostak *et al.*, 1995). La caractéristique principale de cet aptamère est qu'il possède une conformation en G-quadruplex. Elle consiste en une superposition de tétrades de guanines qui forment une poche de liaison d'aspect cubique. La taille de l'aptamère ATP est de 44 nucléotides et sa séquence est :

Séquence :

5'CCTGCCACGCTCCGCTACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT3'

Les guanines impliquées dans la poche de liaison G-quadruplex sont présentées en gras.

L'ATP est un acide nucléique impliqué dans plusieurs processus biologiques. Elle est un important cofacteur pour le transfert d'énergie pour les organismes vivants. L'ATP est aussi un neurotransmetteur et est utilisée en soins intensifs en médecine et comme anesthésiant (Skrabanja *et al.*, 2005). La figure 1.7 présente la structure de l'ATP.

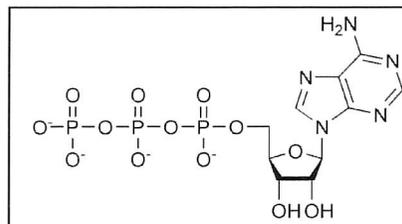


Figure1.7 : Structure de l'adénosine triphosphate.

Lorsque l'ATP lie son aptamère, des changements structuraux affectent ce dernier. Une poche de liaison de forme cubique (G-quadruplex) se forme pour accueillir le ligand comme le montre la figure 1.8.

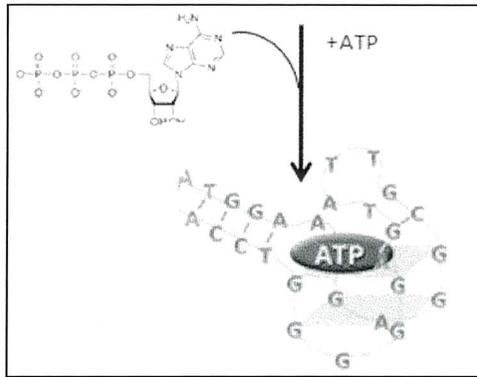


Figure 1.8 : Structure de la pochette de liaison de l'aptamère à l'ATP.

- Aptamère liant l'acide aminé L-arginine (L-Arg):

L'aptamère utilisé pour lier la L-Arg a été sélectionné en 1995 par Kazuo H. et Frankel A.D. (Harada *et al.*, 1995). Il a une affinité de 2.5mM. L'aptamère a une longueur de 28 nucléotides et représente le motif minimal résultant de la cartographie des aptamères candidats issus du SELEX. Sa structure est relativement simple, le motif se replie en une tige de 9 paires de bases et une boucle. La figure 1.9 représente la structure de cet aptamère.

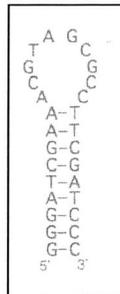


Figure 1.9 : Structure de l'aptamère de la L-arginine.

La séquence de l'aptamère est la suivante :

5' AGGATCGAAACGTAGCGCCTTCGAACTTCC 3'

- Aptamère liant l'éthanolamine :

L'aptamère de l'éthanolamine a été isolé par SELEX en 2005 par Mann D., *et al* (Mann *et al.*, 2005). Il a une structure relativement complexe par rapports aux autres

aptamères modèles. Sa taille est de 80 nucléotides et présente plusieurs tiges et boucles. La figure 1.10 présente la structure de l'aptamère de l'éthanolamine.

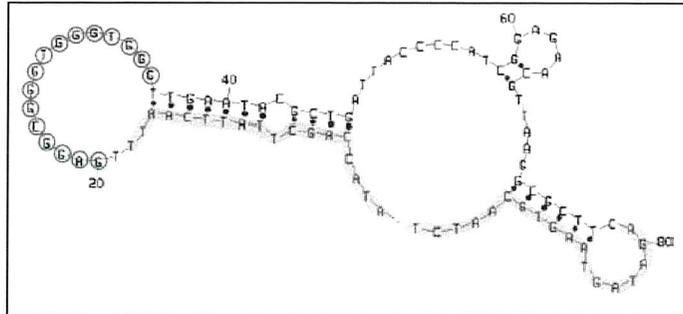


Figure 1.10 : Structure de l'aptamère de l'éthanolamine. Régions grises : amorces d'amplification SELEX. Nucléotides encerclés : motif consensus.

Cet aptamère possède une affinité de 6nM pour son ligand et une structure en G-quadruplex a été prédite au niveau de sa séquence consensus. Sa séquence est la suivante.

```
5'TACCAGCTTATTCAATTTGAGGCGGGTGGGTGGGTTGAATATGCTGATTA  
CCCCATCGGAGAACGTTAAGGCGCTTCAGATAGTAAGTGCAATCT3'
```

L'éthanolamine a un poids moléculaire de 61 daltons et est composé d'une amine primaire et d'un alcool primaire. La figure 1.11 représente la structure chimique de l'éthanolamine.

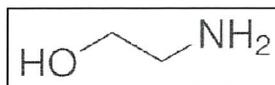


Figure 1.11 : Structure chimique de l'éthanolamine.

2 . PROBLÉMATIQUES, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS:

Les biosenseurs utilisant les acides nucléiques comme molécule de reconnaissance présentent plusieurs avantages. Outre la stabilité de l'ADN et les différentes modifications possibles sur les bases nucléiques, il est possible d'attacher les acides nucléiques sur les fibres optiques grâce à des protocoles bien établis et décrits. Ceci permettrait, grâce à une complémentarité contrôlable, de détecter divers génomes d'intérêt (viraux, bactériens, etc.). D'autre part, ces mêmes protocoles sont utilisables pour attacher des aptamères sur les fibres optiques et détecter des molécules d'intérêt, théoriquement illimitées, grâce à la technique SELEX.

2.1. Développement d'un biosenseur pour la détection de virus d'intérêt :

Les infections virales sont un enjeu de taille. La lutte contre un virus donné passe impérativement par une méthode de dépistage fiable, simple et rapide. Les outils de dépistages disponibles aujourd'hui pour les virus Ebola et VIH-1 nécessitent dans la plupart des cas un personnel qualifié, du matériel de laboratoire et des temps d'attente considérables pour le cheminement des résultats. Dans ce contexte, nous imaginons la possibilité d'utiliser des biosenseurs à fibre optique couplés à des sondes oligonucléotidiques et des nanoparticules d'or pour détecter des acides nucléiques viraux directement dans des échantillons de sang de patients potentiels. Pour ce faire, nous proposons dans ces travaux comme objectif principal la mise en place d'une plateforme de détection d'acides nucléiques en vue de développer un biosenseur à fibre optique. Nous avons défini deux sous-objectifs :

- Mettre en place un protocole de fonctionnalisation par acides nucléiques d'un modèle en silice pouvant remplacer la fibre optique : ceci inclut l'utilisation d'un protocole de modification chimique de la surface de verre pour y inclure des groupements carboxyles (COOH) pour attacher des oligonucléotides (séquences de capture) possédant des groupements amines (NH₂) en 5'. Ceci résulte en une liaison covalente entre le verre et les oligonucléotides. Ces séquences de capture sont complémentaires à des régions spécifiques sur l'ARN viral ciblé. Le but est de permettre l'hybridation de l'ARN viral et ainsi sa fixation indirecte sur la lame de verre.
- Détecter les acides nucléiques cibles avec des sondes spécifiques: la détection de l'ARN viral sera faite par un essai sandwich. Suite à l'hybridation

de l'ARN avec les séquences de capture, une seconde séquence radiomarquée (sonde) s'hybride spécifiquement sur une autre région de l'ARN cible et permet ainsi sa détection par signal radioactif. Lors de l'application des essais de détection sur des fibres optiques, les sondes sont liées sur des nanoparticules d'or (AuNP). La masse des nanoparticules amplifiera le signal de détection dans la fibre optique en modifiant sensiblement l'indice de réfraction de la gaine en cas d'hybridation avec l'ARN viral.

2.2. Mise en place de protocoles pour évaluer l'interaction entre des aptamères d'ADN et leurs ligands :

Les aptamères ADN sont des molécules de détection de choix pour le développement de biosenseurs. Mais l'efficacité de tels dispositifs repose sur la bonne caractérisation des aptamères. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse qu'il est possible de développer un protocole universel pour couvrir les aspects de caractérisation des aptamères.

L'objectif principal de cette section est donc de mettre en place un/des protocole(s) capable(s) de fournir un maximum d'informations quant aux paramètres régissant l'évènement de reconnaissance.

Pour ce faire, trois sous objectifs ont été fixés :

- Mise en place d'un protocole universel pour le *probing* structural des aptamères liés à leurs ligands en utilisant des modifications chimiques par le Diméthylsulfate (DMS).
- Appliquer le protocole SR-PAGE pour mettre en évidence les changements structuraux d'un aptamère en liaison avec son ligand.
- Mise en place de protocoles pour l'analyse de la liaison de l'aptamère à son ligand basés sur la fluorométrie et la dialyse à l'équilibre.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES :

3.1. Développement d'un biosenseur pour la détection de virus d'intérêt :

3.1.1. Modèle de mise en place d'une plateforme de détection d'ARN viraux :

Afin de mettre en place un protocole de détection d'ARN viraux par des fibres optiques, un modèle a été choisi pour simplifier la manipulation et l'optimisation du protocole de fonctionnalisation de surface de verre. Pour notre modèle, nous avons choisi les lames de microscope Fisherbrand Microscope Slides (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) représentées dans la figure 3.1.

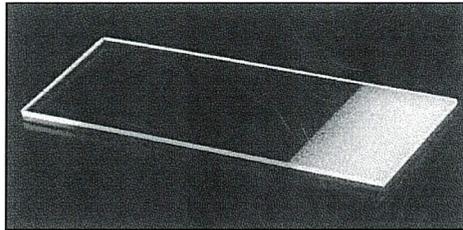


Figure 3.1. Lame de microscope Fisherbrand.

La lame a une épaisseur de 1mm. Elle est en silice non modifiée à sa surface à la réception. La partie blanche correspond à une zone rugueuse pour faciliter l'étiquetage et l'écriture sur la lame.

3.1.2. Modification de la surface de verre par silanisation :

Afin de lier de manière stable les séquences de capture, la surface est modifiée pour y attacher des groupements COOH. La disponibilité d'un groupement NH_2 en 5' des séquences de capture va permettre une liaison covalente entre le verre et celles-ci.

Avant de fonctionnaliser les surfaces de verre, celles-ci sont soumises à un nettoyage rigoureux avec une solution Piranha (3 :1 acide sulfurique (H_2SO_4):peroxyde d'hydrogène(H_2O_2)). La fonctionnalisation de la silice est faite ensuite par silanisation. Ce protocole permet l'attachement de groupements silanes (SiH_4) qui se lient sur les groupements OH à la surface du verre par le Triéthoxysilylpropylsuccinic anhydride (TESPSA) (Sigma Aldrich, Missouri, USA) (modifié des travaux de (Gang *et al.*, 2015)). Les groupements silanes contiennent une boucle qui, une fois hydrolysée, donne deux groupements COOH disponibles

pour la liaison des ADN (Figure 3.2). Un lavage avec un tampon PBS 1x ou de l'eau permet d'éluier les ADN non attachés à la surface. La silice ainsi fonctionnalisée peut être gardée à 4°C. Le tableau 3.1 résume le protocole de silanisation de surfaces de verre.

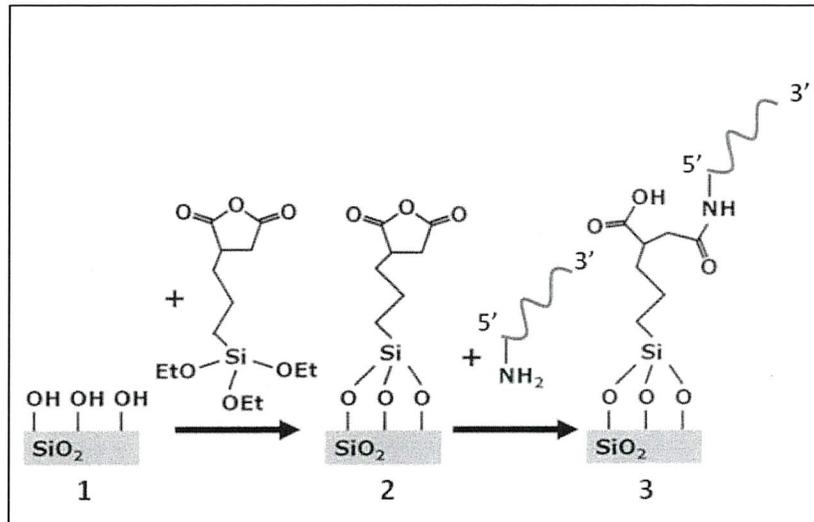


Figure 3.2 : Fonctionnalisation de la surface du verre par silanisation. (1) Le verre dispose de groupement OH libres à sa surface. (2) La silanisation par TESPAS permet de lier les groupements silanes sur les OH de la silice. (3) Activation des silanes par hydrolyse des groupement succinique anhydride et liaison covalente de l'ADN modifié par NH_2 en 5' (modifié de (Gang *et al.*, 2015))

Tableau 3.1 : Protocole de silanisation des surfaces de verre (modifié de (Gang et al., 2015))

Étape	Produit	Procédure	Fournisseur
Nettoyage	Solution Piranha	-Préparer une solution 3 :1 $H_2SO_4^{(1)} : H_2O_2^{(1)}$ -Immerger les lames dans la solution pendant 24h -Rincer à l'EtOH 100% ⁽²⁾ et H ₂ O -Sécher	(1) Sigma Aldrich (2) Les alcools de commerce
Silanisation	TESPSA	-Préparer une solution 2% TESPSA ⁽¹⁾ diluée dans une solution 95 :5 acide acétique ⁽²⁾ :EtOH ⁽²⁾ 100% -Immerger pendant 5 minutes à température ambiante pour silaniser -Rincer avec EtOH 100% -Sécher	(1) Sigma Aldrich (2) Les alcools de commerce
Fonctionnalisation	Solution stock ADN 50µM	-Disposer l'ADN ⁽¹⁾ en spots de 7µL directement sur la lame de verre -Laisser pendant 1 heure dans une enceinte humide (boite fermée avec un bêcher rempli de H ₂ O) -Rincer avec H ₂ O et sécher	(1) Biocorp DNA

3.2. Conception des oligonucléotides et synthèse *in vitro* de l'ARN viral :

Le choix des ARN viraux cibles pour la détection par fibres optiques s'est porté sur certaines des régions du génome les plus conservées de par les sérotypes des virus SEBOV et VIH-1.

- Gène *np* de la nucléoprotéine du virus SEBOV

Le gène ciblé dans la détection par fibre optique est le gène *np* qui code pour la nucléoprotéine du virus SEBOV. Un alignement multiple de génomes de différentes

souches du virus Ebola a permis de détecter une conservation de la séquence de ce gène comme le montre la figure 3.3.

Reston ebolavirus - Reston strain Reston08-C, complete genome				
Sequence ID: gb FJ621584.1 Length: 18836 Number of Matches: 4				
Range 1: 514 to 1693 GenBank Graphics ▼ Next Match				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
850 bits(942)	0.0	900/1183(76%)	6/1183(0%)	Plus/Plus
Cote d'Ivoire ebolavirus, complete genome				
Sequence ID: gb FJ217162.1 Length: 18935 Number of Matches: 8				
Range 1: 521 to 1853 GenBank Graphics ▼ Next Match				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
774 bits(858)	0.0	974/1336(73%)	6/1336(0%)	Plus/Plus
Tai Forest ebolavirus isolate Tai Forest virus/H sapiens-tc/CIV/1994/Tai Forest-CDC807212, complete genome				
Sequence ID: gb KU182910.1 Length: 18935 Number of Matches: 8				
Range 1: 521 to 1853 GenBank Graphics ▼ Next Match				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
774 bits(858)	0.0	974/1336(73%)	6/1336(0%)	Plus/Plus
Bundibugyo virus isolate Bundibugyo virus/H sapiens-tc/UGA/2007/Bundibugyo-200706291, complete genome				
Sequence ID: gb KU182911.1 Length: 18940 Number of Matches: 4				
Range 1: 499 to 1762 GenBank Graphics ▼ Next Match				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
847 bits(938)	0.0	946/1264(75%)	0/1264(0%)	Plus/Plus

Figure 3.3 : Conservation du gène *np* codant pour la nucléoprotéine du genre *Ebolavirus*. (encadrés jaunes): espèce de provenance du gène *np* alignée contre le gène *np* de SEBOV, (encadré rouge): pourcentage d'identité entre les deux séquences de gènes alignés.

Une portion du gène *np* de 230 nucléotides particulièrement conservés et relativement riche en GC a été choisie pour développer le biosenseur à fibre optique (du nucléotide 850 au 1080). La séquence est présentée dans la figure 3.4.

```

ORIGIN
1  cggacacaca  aaaagaaaga  aaagtttttt  atactttttt  tgtgcgaata  actatgagga
61  agattaatca  ttttctcaa  actcaacta  atattaacat  tgagattgat  ctcatcattt
121  accaattgga  gacaatttaa  ctagtcaatc  cccatttgg  gggcattcct  aaagtgtgc
181  aaaggtatgt  gggctgtatt  gctttgctt  ttcctaacct  ggctcctcct  acaattctaa
241  cctgcttgat  aagtgtgatt  acctgagtaa  tagactaatt  tcgtcctggt  aattagcatt
301  ttctagttaa  accaatacta  tctcaagtcc  taagagaagg  tgagaagaag  gtcccagggt
361  atccctccag  tccacaaaat  ctagtcaatt  ttagctgagt  ggaactgatta  ctctcatcac
421  acgtaacta  ctaagggttt  acctgagagc  ctacaacatg  gataaacggg  tgagagggtc
481  atgggcccgt  ggaggacaat  ctgaagttga  tcttgactac  cacaaaatat  taacagccgg
541  gctttcggtc  caacaaggga  ttgtgcgaca  aagagtcac  ccggtatatg  ttgtgagtga
601  tcttgagggt  atttgtcaac  atatcattca  gccctttgaa  gcaggcgtag  atttccaaga
661  taatgctgac  agcttccctt  tacttttatg  tttacatcat  gtttaccagg  gagatcatag
721  gctcttcttc  aaaagtgatg  cagttcaata  cttagagggc  catggtttca  ggtttgagggt
781  ccggaaaaag  gagaatgtgc  accgtctgga  tgaattgttg  cccaatgtca  ccggtgaaa
841  aaatcttag  agaaccattg  ctgcaatgcc  tgaaggagg  acaaccagaag  ctaatgctgg
901  tcagttttta  tcctttgcca  gtttgtttct  acccaactt  gtcgttgggg  agaagccttg
961  tctgaaaaaa  gtacaagggc  agattcaggt  ccatgcagaa  caagggtcct  ttcaatctcc
1021  aacttccctg  caatcagttg  gacacatgat  ggtgatcttc  cgtttgatga  gaacaaactt
1081  tttaatcaag  ttctactaa  tacatcaggg  gatgcacatg  gtcgaggcc  atgatgcgaa

```

Figure 3.4 : Séquence cible du gène *np* du SEBOV. (encadré jaune) : séquence cible

- Gène *gag* du virus VIH-1

Le gène cible choisi pour la détection du virus VIH-1 est le gène *gag* dans les deux régions p17 et p24. La protéine de la matrice p17 codée au début de la région cible est une protéine très importante dans le cycle de réplication du virus. La protéine p24 forme quant à elle la capsid du virus. De ce fait, la région cible est hautement conservée de par les groupes VIH-1. La figure 3.5 montre la séquence choisie ainsi que sa localisation sur le génome du VIH-1.

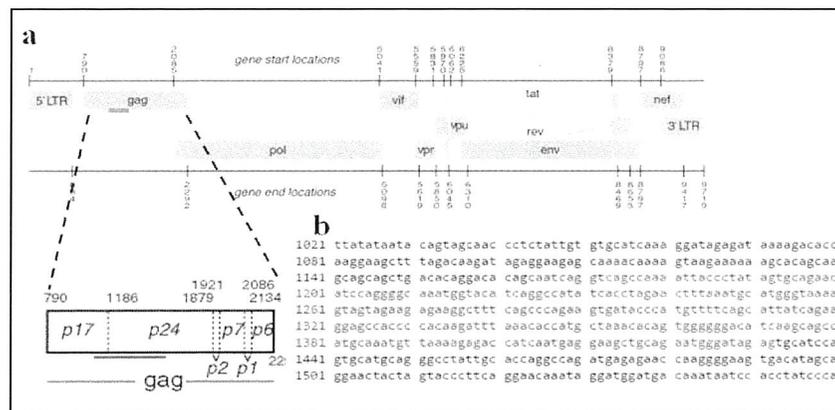


Figure 3.5 : Séquence cible du gène *gag* du virus VIH-1. (a) La séquence ciblée couvre une partie des régions p17 et p24 du gène *gag*. (b) La séquence cible s'étend sur 268 nucléotides, de la position 1164 à 1432.

L'utilisation du VIH-1 en laboratoire nécessite un niveau de confinement 3 (ou 2 avec restrictions) et SEBOV nécessite un niveau de confinement 4. Pour ce faire, il a été nécessaire de reproduire les séquences cibles des virus *in vitro* par PCR d'assemblage. Les ADN cibles des deux virus ont été synthétisés en même temps pour appréhender d'éventuels problèmes techniques liés au bon déroulement des PCR et de la transcription.

3.2.1. Synthèse *in vitro* de l'ADN matrice par PCR d'assemblage

Afin de produire les fragments d'ARN correspondant aux génomes de SEBOV et VIH-1, donc le type d'acides nucléiques que ces virus produisent lors d'une infection, nous avons procédé à la transcription de la portion de gènes choisies en laboratoire.. Pour ce faire, une PCR d'assemblage (Figure 3.6) a permis d'obtenir une matrice ADN du fragment. Les tableaux 3.2 et 3.3 résument les différentes séquences utilisées pour la synthèse de matrices ADN.

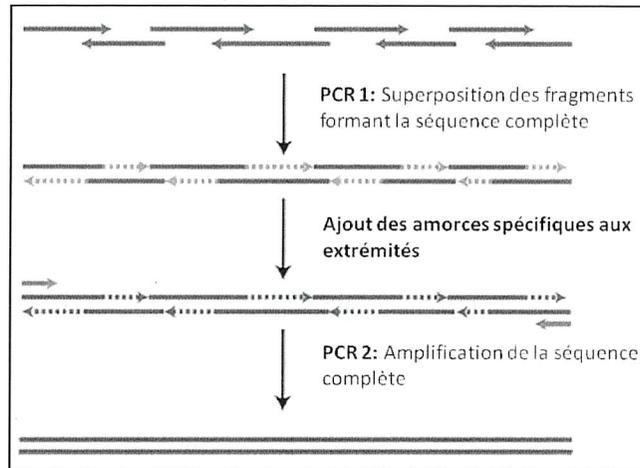


Figure 3.6 : Étapes de la PCR d'assemblage. La PCR d'assemblage vise à former une séquence oligonucléotidique de grande taille in vitro en utilisant une fragmentation de celui-ci en plusieurs morceaux. Une première PCR sert à lier les différents fragments qui contiennent des régions complémentaires superposées (région pointillées en bleu clair). Une première amplification par une polymérase permet d'obtenir le fragment complet double brin. Une deuxième PCR utilisant des amorces spécifiques aux régions 3' et 5' du fragment complet permet d'amplifier la séquence d'intérêt.

Tableau 3.2 : Séquences des amorces pour la synthèse de la matrice ADN de la portion du gène *np* de SEBOV.

	Amorces	Sens	Séquence (5'-3')	T _m (°C)
1	FK039 NOT7	Sens	AAATCTTAGGAGAACATTGGCTGCAATGCCTGAAGAGG AGACAACAGAAGCTA	68
2	FK040	Anti-sens	GGTAGAAACAACTGGCAAAGGATAAAAACTGACCAGC ATTAGCTTCTGTTGTCTCCTCTTCAG	68
3	FK041	Sens	CTTTGCCAGTTTGTCTACCCAACTTGTCGTTGGGGA GAAAGCGTGTCTGGAAAAAGTACA	69,7
4	FK042	Anti-sens	TATTGAATGAGCCCTTGTTCTGCATGGACCTGAATCTG CCTTTGTA CTTTTCCAGACACGCTTTC	69,7
5	FK043	Sens	CATGCAGAACAAGGGCTCATTCAATATCCAACCTCCTG GCAATCAGTTGGACACATGATGGTGAT	69,9
6	FK044	Anti-sens	CTTGATTAAAAAGTTTGTCTCATCAAACGGAAGATCAC CATCATGTGTCCAACCTG	65,6
7	FK045 T7	Anti-sens	CTTGATTAAAAAGTTTGTCTCATCAAACGGGATATCAC TCAGCATAAT	62,2

Tableau 3.3 : Séquences des amorces pour la synthèse de la matrice ADN de la portion du gène *gag* de VIH-1.

	Amorces	Sens	Séquence (5'-3')	T _m (°C)
1	FK032 T7	Sens	TAATACGACTCACTATAGG CAATCAGGTCAGCCAAAAT TACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAATGGTA	69,8
2	FK033	Anti-sens	CTACTTTTACCCATGCATTTAAAGTTCTAGGTGATATGG CCTGATGTACCATTTGCCCTGGATGTTC	68,6
3	FK034	Sens	AACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGG CTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTTC	68
4	FK035	Anti-sens	GCATGGTGTTTAAATCTTGTGGGGTGGCTCCTTCTGAT AATGCTGAAAACATGGGTATCACTTCTGG	69,5
5	FK036	Sens	CCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGG GACATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAG	70
6	FK037	Anti-sens	CTCTATCCCATTCTGCAGCTTCCTCATTGATGGTCTCTT TTAACATTTGCATGGCTGCTTG	68,7
7	FK038	Anti-sens	CTCTATCCCATTCTGCAGCTTC	55,3

Pour la synthèse des ADN matrices représentatifs des deux virus ci-haut, les amorces utilisées contiennent des régions complémentaires (deux par deux) pour permettre l'assemblage de la séquence finale désirée. Une PCR d'assemblage se fait en deux étapes :

- 1ère partie : Assemblage de la séquence totale, en utilisant toutes les amorces de 1 à 6.

La réaction PCR comporte en excès les amorces externes (2 et 6) à 2µM. Les amorces internes (3, 4 et 5) sont concentrées à 0,2 µM. A cela sont ajoutés (en concentrations finales) l'enzyme HotStart Plus Taq à 2,5unités/réaction (selon les recommandations du manufacturier), 1x de tampon d'élongation fourni avec l'enzyme, 2mM de MgCl₂ et 0,2 mM de dNTP. La réaction de polymérisation est assurée par une machine PCR T100™ Thermal Cycler (Biorad, Ontario, Canada). Le programme utilisé comporte une phase de prédénaturation (3 minutes, 95°C), une

phase de dénaturation (1 minute, 95°C), une phase d'hybridation (30 secondes, gradient de température entre 60°C et 65°C pour SEBOV et VIH-1) et une phase d'élongation (1 minute à 72°C). Le cycle est répété 25 fois et est suivi par une phase de post-élongation (5 minutes à 72°C). Un gel d'électrophorèse à 2% est nécessaire pour vérifier la présence du fragment d'intérêt. Le fragment de l'ADN matrice complet (230 paires de bases (pb) pour SEBOV, 268pb pour VIH-1) est ainsi obtenu.

- 2ème partie : Amplification de la séquence désirée en utilisant les deux amorces 1 et 7.

L'amplification du fragment complet obtenu utilise 10µL du produit de la première PCR en ajoutant 2µM des amorces 1 et 7. La même réaction PCR (décrite plus haut) est faite pour un volume final de 100µL. L'amplification est programmée avec les mêmes paramètres décrits plus haut. Un gel d'agarose à 2% est aussi nécessaire pour vérifier l'amplification du fragment d'intérêt.

3.2.2. Transcription *in vitro* des fragments ARN de VIH-1 et SEBOV :

Pour l'amplification de l'ADN viral, l'amorce 1 contient la séquence T7 (en gras dans le tableau 3.2 et 3.3) permettant la fixation de l'ARN polymérase T7 pour la transcription. Étant donné que l'ARN du virus VIH-1 est de polarité positive, la séquence T7 est localisée sur le brin positif de l'ADN produit par la PCR. Dans le cas du virus SEBOV, l'ARN est de polarité négative. Pour l'obtenir, la séquence T7 est déplacée sur l'amorce 7 en 3'. Ceci permet de transcrire le brin anti-sens de l'ADN produit par la PCR ce qui, donne un ARN de polarité négative.

Un protocole de transcription permet l'obtention de l'ARN représentatif de l'ARN viral. Pour ce faire, on utilise une ARN polymérase T7 purifiée en laboratoire, dans une réaction dont les composants sont présentées dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Réaction de transcription.

Composant	Concentration finale	Source
ADN matrice	1 μ M	PCR d'assemblage
ARN polymérase T7	1 unité/ μ L	Purifiée en laboratoire
Tampon de transcription	1X	Préparé en laboratoire
Ribonucléotides (A,U,C,G)	2mM chacun	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
Pyrophosphatase inorganique	1 unité/ μ L	Sigma Aldrich, USA
Inhibiteur de RNases	1 unité/ μ L	NEB (Massachusetts, USA)
H ₂ O MilliQ	Jusqu'à volume final désiré	-

La réaction de transcription dure 2 heures à 37°C. Par la suite, un traitement à la DNase (NEB, Massachusetts, USA) à 1 μ L d'enzyme/50 μ L de réaction pendant 30 minutes permet de dégrader les fragments d'ADN restants. Les étapes suivantes permettent la récupération de l'ARN obtenu :

- Extraire l'ARN au phénol/chloroforme (1 :1), à la réaction de transcription est ajouté le même volume de phénol :chloroforme, centrifuger à 14000 rotations par minutes (rpm) pendant 2 minutes, récupérer la phase aqueuse, ajouter 1 :1v de chloroforme, centrifuger à 14000rpm pendant 2 minutes, récupérer la phase aqueuse.
- Précipiter la fraction récupérée avec 0,1v d'acétate de sodium (NaOAc) 3M, pH 5,2 et 2,5v d'Ethanol (EtOH)100% pendant 2 heures à -20°C. Centrifuger à 14000rpm pendant 20 minutes, ajouter 200 μ L d'EtOH 70% pour nettoyer, centrifuger à 14000rpm pendant 20 minutes. Sécher le culot.
- Resuspendre le culot dans 20 μ L de solution de formamide bleu (0,3% bleu de bromophénol (BBP), 0,3% de xylène cyanol (XC), 12mM EDTA, formamide).

- Migrer dans un gel polyacrylamide dénaturant (dPAGE) à 10% pour sélectionner la bande ayant la taille désirée correspondante à l'ARN d'intérêt. Le tableau 3.5 présente les composants d'un dPAGE à 10% pour un volume final de 40mL.

Tableau 3.5 : Composition d'un dPAGE 10%.

	Volume ajouté
Solution Acrylamide/Bis Acrylamide 20% 19 :1, urée 8M, TBE 1X	20mL
Solution Urée 8M (8M urée, TBE 1X (89mM Tris pH 7,6, 89mM acide borique, 2mM EDTA))	20mL
TEMED	16µL
APS 10%	320µL

Légende : TEMED : TETraMéthylEthylèneDiamine, APS : Ammonium PerSulfate, TBE: Tris Borate EDTA (voir plus bas).

Les ARN issus de la transcription sont chargés en entier. Le gel permet la migration grâce à l'application d'un courant continu de 15 watts (W) pendant 45 minutes. Le courant passe à travers le gel grâce au tampon de migration TBE 1x (89mM Tris pH 7.6, 89mM acide borique, 2mM EDTA). A terme, la localisation des bandes d'intérêt est faite sous UV grâce à l'ombre créée sur une plaque fluorescente par l'absorbance des UV par l'ARN. Les bandes correspondantes sont par la suite excisées et éluées du gel dans une solution saline d'éluion (EDTA 0,1M, NaCl 0,3M, SDS 0,001%) pendant 3 heures. Par la suite, la fraction liquide contenant les ARN est précipitée comme décrit plus haut pendant 3 heures à -80°C. L'ARN précipité est récupéré par centrifugation à 14000rpm pendant 20 minutes, puis nettoyé avec 200µL d'EtOH 70% et centrifugé dans les mêmes conditions. L'ARN obtenu est resuspendu dans 20µL d'eau MilliQ stérilisée et quantifié au Nanodrop 1000 (Thermofisher Scientific, Massachussets, USA) à 260nm.

3.2.3. Conception des sondes de détection des ARN viraux et radiomarquage :

Afin de détecter l'ARN viral désiré, deux séquences complémentaires sont nécessaires. La première est couplée directement sur la surface en silice (lame de verre/fibre optique) et sera appelée séquence de capture. La deuxième permet la détection de l'ARN cible grâce à un marquage radioactif et/ou liaison sur une nanoparticule d'or et sera appelée sonde.

Pour la conception des séquences de captures et des sondes, des régions riches en GC des ARN viraux ont été ciblées pour augmenter la stabilité de l'hybridation. Le tableau 3.6 décrit les différentes séquences utilisées pour la détection des deux ARN viraux cibles (SEBOV et VIH-1).

Tableau 3.6 : Séquences de capture et sondes utilisées pour la détection des ARN cibles des virus SEBOV et VIH-1.

Virus ciblé	Spécifications	Séquence 5'-3'
SEBOV	Séquence de capture	(NH ₂) AAAAAAAAA GAGAACATTGGCTGCAATGCC
	Sonde	CCAGCATTAGCTTCTGTTGTCTCCTCTTCAGGCATTG CAGCCAATGTTCTC(SH)
VIH-1	Séquence de capture	(NH ₂) AAAAAAAAA CCCATCTGCAGCTTCCTCAT
	Sonde	ATGAGGAAGCTGCAGAATGGG(SH)

NH₂ : groupement amine pour la fonctionnalisation de la silice, **SH** : groupement thiol pour le couplage aux AuNP

Les séquences captures contiennent 10 adénines supplémentaires en 5' (en gras Tableau 3.6). Ces adénines constituent un espaceur pour garantir un espacement entre la séquence et la lame de verre et donc plus de liberté de repliement et de mouvement moléculaire nécessaires pour l'hybridation.

- Radiomarquage des sondes oligonucléotidiques :

Les sondes sont radiomarquées en 5' par un phosphate radioactif par l'enzyme Polynucléotide Kinase, T4 PNK (NEB, Ontario, Canada). Le radiomarquage consiste

en l'ajout d'un phosphate ^{32}P à partir d'ATP radioactive (Perkin Elmer, Canada) en 5' des oligonucléotides. Le protocole est décrit dans le tableau 3.7.

Tableau 3.7 : Réaction de radiomarquage des sondes par la PNK.

Composant	Concentration finale	Source
ADN matrice	1 μM	Biocorp DNA (Québec, Canada)
Enzyme T4 PNK	1 unité/ μL	NEB (Ontario Canada)
Tampon de phosphorylation	1x	NEB (Ontario, Canada)
$\gamma\text{AT}^{32}\text{P}$	10 μCi	Perkin Elmer (Québec, Canada)
H_2O	Jusqu'à volume final	-

La réaction de phosphorylation dure 1h30 et est faite à 37°C. Par la suite, les oligonucléotides sont purifiés sur dPAGE. A la fin de la migration, la petite vitre du gel est enlevée et le gel est enveloppé dans deux couches de papier cellophane. Les bandes radiomarquées correspondants aux tailles des ADN d'intérêt sont détectées par exposition sur une cassette radiologique (Molecular Dynamics, Israel). La radioactivité présente dans le gel laisse une empreinte sur la cassette qui est ensuite révélée par un scan au Typhoon FLA9500 (GE Healthcare, UK). 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. Une fois les bandes définies, elles sont excisées et éluées pendant trois heures pour récupérer les ADN, puis ceux-ci sont précipités (selon le protocole décrit en 3.2.1). La quantification au Nanodrop n'est cependant pas possible. La quantification de sondes radiomarquées est faite avec un compteur Geiger (Ludlum Measurements, Texas, USA). Le compteur permet d'évaluer l'intensité relative de la radioactivité en comptes par minute (cpm) des radiations générées .

- Fonctionnalisation des AuNP avec des sondes oligonucléotidiques :

Des AuNP de 40nm de diamètres ont été synthétisées en laboratoire à partir d'un protocole de réduction par le citrate de sodium. Pour ce faire, 1mM d'acide

chloraurique (HAuCl_4) (Sigma Aldrich, USA) est chauffé jusqu'à ébullition sous agitation continue. A l'ébullition, 38,8mM de citrate de sodium ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (Sigma Aldrich, USA) sont ajoutés et la solution est maintenue à ébullition pendant 10 à 15 minutes. Lorsque la couleur de la solution change du jaune au rouge foncé, le chauffage est arrêté, mais l'agitation est maintenue pendant encore 15 minutes. La solution ainsi préparée peut être conservée à 4°C.

Pour la fonctionnalisation des AuNP, les sondes spécifiques sont modifiées en 3' par une fonction thiol (SH) (AlphaDNA, Canada). Pour ce faire, 10 μM d'ADN modifié sont incubés dans 50mM de *tris*(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) (Sigma Alrich, USA) pendant 1 heure. Le TCEP est un agent réducteur capable de casser les ponts disulfures et permet à ce stade de préparer les ADN modifiés à l'attachement à la surface des AuNP. Les ADN sont par la suite récupérés grâce à une série de lavage par centrifugation à l'eau MilliQ. Les ADN ainsi obtenus sont quantifiés au Nanodrop et ajoutés dans un ratio 1000 :1 aux AuNP. Du tampon citrate (0,5M acide citrique, 0,5 sodium citrate, pH3,0) est ajouté au mélange ADN-AuNP et le tout est incubé 5 minutes à température ambiante. Du tampon phosphate est ajouté (0.01M pH7.4) et la solution est centrifugée à 14000rpm pendant 20 minutes pour récupérer les complexes ADN-AuNP. La procédure est refaite deux fois pour obtenir les complexes resuspendus dans 100 μL de tampon phosphate.

- Radiomarquage des sondes oligonucléotidiques couplées aux AuNP :

Les mêmes sondes décrites dans le tableau 3.6 sont utilisées pour le couplage aux AuNP. Néanmoins, 10 adénines sont ajoutées en 3' pour garantir une liberté de repliement de la séquence. Les sondes étant couplées en 3' par la fonction thiol aux AuNP, les extrémités 5' restent disponibles au radiomarquage par le ^{32}P par l'enzyme PNK. Pour ce faire, une réaction de marquage (décrite en 3.2.3, tableau 3.7) est préparée où la matrice à marquer est 5pM de complexe ADN-AuNP. Suite au marquage, 450 μL de tampon phosphate sont ajoutés et la réaction est centrifugée à 14000rpm à -9°C pendant 30 minutes. Le surnageant est jeté et le culot comprenant les complexes est resuspendu dans 450 μL de tampon phosphate et centrifugé dans les mêmes conditions. La procédure de centrifugation est répétée jusqu'à obtention d'un surnageant ne contenant qu'un bruit de fond de radioactivité. Cette étape

permet l'élimination des $AT^{32}P$ libres et ne garder que les AuNP fonctionnalisées avec les ADN radiomarqués.

3.3. : Mise en place de protocoles pour évaluer l'interaction entre des aptamères d'ADN et leurs ligands :

Deux aspects de l'étude des aptamères et leurs ligands ont été explorés dans les travaux qui suivent. Le premier est l'analyse de l'évènement de liaison et le calcul de la constante de dissociation K_D . Le second est l'analyse des modifications structurales qui touchent l'aptamère en présence ou absence du ligand. Pour ce faire, plusieurs protocoles ont été testés pour fournir de plus amples informations sur les trois aptamères modèles choisis ainsi que leurs ligands respectifs (Chap.1.2.5).

3.3.1 : Analyse de la liaison par Shifted Reverse-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SR-PAGE) :

Le SR-PAGE est une technique innovante développée dans le laboratoire du Pr. Jonathan Perreault de l'INRS-Institut Armand Frappier. Elle a été mise en place en 2010 afin d'accompagner la sélection des aptamères à partir de bibliothèques SELEX. Le principe de la sélection par SR-PAGE est une discrimination basée sur le repliement de la séquence interagissant avec la molécule d'intérêt causant le gain de vitesse une migration électrophorétique.

Nous utilisons cette caractéristique de la technique du SR-PAGE pour analyser la spécificité de la liaison d'aptamères à leurs ligands. Nous utilisons pour ces essais l'aptamère ATP (Chap.1.2.5) ainsi qu'un aptamère ARN liant la thiamine pyrophosphate (TPP) (Hallera, 2013) comme contrôle négatif. Les différentes étapes nécessaires pour un protocole SR-PAGE sont décrites ici en ordre chronologique.

a- 1^{ère} Migration sur gel PAGE natif 10% :

Afin de conserver la structure des aptamères, ceux-ci sont migrés sur un gel PAGE natif (nPAGE). La préparation d'un nPAGE à 10% pour un volume final de 200mL est décrite dans le tableau 3.8.

Tableau 3.8 : Préparation d'un gel nPAGE 10%.

	Volume ajouté	Concentration finale
Solution Acrylamide/Bis-acrylamide 30% (29 :1)	66.6mL	10%
Tampon TBMg 10X	20mL	1x
H ₂ O	113.4mL	-

Abbreviations : TBMg 10X (Tris-Borate Magnésium, 0,9M Tris Base, 0,9M acide borique, 0,2M MgCl₂).

Il faut diviser le mélange en deux fractions de 160mL et 40mL. Cette dernière est gardée à 4°C pour la suite des manipulations. A la solution de 160mL sont ajoutés 64µL de TEMED et 1380µL d'APS 10%.

- Montage du gel : Les vitres du gel sont montées de manière à laisser la petite vitre dépasser d'environ 1cm en bas. Le gel est coulé et laissé à polymériser pendant 1h puis il est monté dans le dispositif d'électrophorèse (Owl™ Aluminium-backed Sequencers, ThermoFisher Scientific, USA).
- Migration du gel : Le dispositif est mis dans une chambre à 4°C et un générateur de courant est utilisé (Biorad, USA) pour appliquer un courant continu de 300 volts. Le gel est mis sous tension à vide pendant 24h. Par suite, les aptamères radiomarqués sont dilués à différentes concentrations (volume final de 40µL), chauffés à 95°C pendant 5 minutes et refroidis. Lorsque la température des aptamères regagne 25°C, ceux-ci sont chargés dans les puits du gel selon la réaction décrite dans le tableau 3.9.

Tableau 3.9 : Réaction de migration d'aptamères pour SR-PAGE.

	Volume ajouté	Concentration finale
Aptamère froid (stock 100µM)	x µL	10µM, 100µM, 250µM, 500µM
Aptamère ³² P	À diluer selon cpm/stock	1000cpm
Tampon TBMg 10x	1µL	1x
Bleu de migration natif 6X	6µL	1x
H ₂ O	Jusqu'à 40µL	

La première migration dure 24h, du haut (pôle négatif) vers le bas (pôle positif) du gel. Elle se fait à 4°C avec un voltage constant de 300 volts. La migration est assurée par le tampon de migration TBMg 1X déposé dans les bacs conçus pour ce fait dans le dispositif à électrophorèse. Le gel est circulé d'un bac à tampons vers l'autre grâce à une pompe péristaltique.

b- Saturation du gel avec le ligand :

Au bout de 24h de migration, le gel est arrêté. Le tampon de migration dans le bac du haut est récupéré dans un erlenmeyer et réservé pour la 2ème migration. La figure 3.7 représente un gel arrêté à la fin de la première migration.

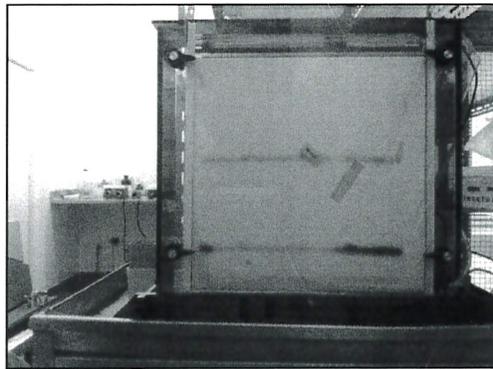


Figure 3.7 : Gel arrêté au bout de 24h de la première migration d'un SR-PAGE (Travaux de Jonathan Ouellet, Laboratoire Jonathan Perreault, 2012).

Les bleus de migrations sont séparés dans le gel. Les vitres contenant le gel sont déplacées dans un bac et démontées. Le gel doit rester en place et intact. L'excès de liquide sur les bords du gel est absorbé à l'aide de papier Kimwipes (KCprofessional, USA) en prenant soin d'éviter de le déchirer, plier ou froisser. Le tableau 3.10 décrit les étapes suivant le démontage du gel ainsi que le matériel nécessaire.

Tableau 3.10 : Étapes de démontage du gel suite à la première migration du SR-PAGE.

Étape	Procédure	Matériel
1- Démontez les vitres	<ul style="list-style-type: none"> - Disposer les vitres dans un bac en position inclinée - Enlever les espaceurs et décoller la petite vitre en prenant soin de laisser le gel intact 	<ul style="list-style-type: none"> - Papier kimwipes pour essuyer les bords du gel - Spatule pour décoller la petite vitre
2- Couper les puits et asperger avec le ligand	<ul style="list-style-type: none"> - Bien nettoyer les espaces de vitre entourant le gel. - Remettre le gel en position horizontale. - À l'aide d'une lame de rasoir, couper environ 1mm au-dessus des puits pour ne garder qu'une ligne droite en haut du gel. - Préparer une solution d'ATP à asperger sur la surface du gel (en insistant sur le haut du gel et entre les bleus de migration). - Laisser la solution de ligand s'incorporer dans le gel pendant environ 20 minutes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Papier kimwipes - lame de rasoir - Solution de 20mL d'ATP diluée dans du TBMg 1x
3- Remonter les vitres et combler l'espace avec du gel	<ul style="list-style-type: none"> - Après incorporations, remettre les espaceurs en prenant soin de ne pas déchirer les bords du gel. - Faire couler à l'aide d'une pipette 50µL de TEMED sur le bord des puits coupés. - Remettre la petite vitre sans 	<ul style="list-style-type: none"> - TEMED - APS 10% - Solution 40mL d'acrylamide natif supplémentée du ligand.

	<p>laisser d'espace en bas.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ajouter 16µL de TEMED et 320µL d'APS 10% au 40mL de solution d'acrylamide natif réservés à 4°C. - Combler le gel en coulant l'acrylamide et laisser polymériser en position horizontale pendant 30 minutes à 1 heure. 	
4- Remettre à migrer	<ul style="list-style-type: none"> - Remettre le gel dans le dispositif à électrophorèse à 4°C. - Remettre le tampon de migration dans le bac du haut. - Repartir la migration en prenant soin d'inverser les polarités, à 300 volts, pendant 24 heures. 	<ul style="list-style-type: none"> - Chambre à 4°C - Dispositif d'électrophorèse - Générateur

c- 2^{ème} Migration sur gel :

Asperger le gel avec une solution du ligand vise à le saturer. En inversant les polarités de la migration du gel, les aptamères vont rebrousser chemin et migrer en sens inverse. Lorsqu'un aptamère capable de lier l'ATP est présent, il se replie au contact du ligand. Cette liaison lui confère un avantage de vitesse (structure plus compacte) et donc il sera capable de migrer plus rapidement. Après 24 heures (ou temps exacte de la première migration) les aptamères ayant lié l'ATP dépasseront le niveau des puits. Quant à ceux qui n'auront pas lié l'ATP (et donc conservé leur structure initiale) ils reviendront exactement au point de départ (ligne des puits).

3.3.2. Analyse de la liaison par fluorométrie :

L'analyse de la liaison d'un aptamère à son ligand par fluorométrie consiste en la quantification de l'intercalation d'un fluorophore dans la structure de l'aptamère selon la présence ou l'absence de son ligand. Les aptamères modèles utilisés (liant l'ATP, la L-Arg et l'éthanolamine) présentent des structures liées ayant des régions doubles

brins absentes théoriquement dans les structures natives. Dans ce cadre, nous avons opté pour l'utilisation de l'agent intercalant SYBR-Safe (ThermoFisher Scientific, USA) pour sonder les changements structuraux qui régissent la liaison de ceux-ci à leurs ligands respectifs. La figure 3.8 présente la structure du SYBR-Safe.

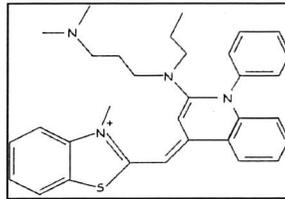


Figure 3.8 : Structure du SYBR-Safe. (Safdar *et al.*, 2011)

Le SYBR-Safe a une longueur d'onde d'excitation optimale de 280 ou 502nm pour une longueur d'onde d'émission de 530nm. La fluorescence émise est quantifiée dans un fluorimètre Infinite[®] M1000 Pro (Tecan, Morisseeville, USA). Cet appareil nécessite l'utilisation d'une plaque 96 puits (Corning, New York, USA) pour le dépôt des échantillons à analyser. Ces plaques sont opaques, en polystyrène et à fond plat. Le polystyrène est traité pour empêcher des événements de liaison non spécifiques à la paroi. Les puits des plaques prennent des volumes compris entre 25 et 125 μ L.

Pour les essais décrits ici, le volume final par puits est de 100 μ L.

- Quantification de l'intercalation du SYBR Safe dans l'ADN :

Dans un premier temps, nous avons mesuré par fluorométrie l'intercalation du SYBR Safe dans de l'ADNdb *versus* de l'ADNsb. D'autre part, nous avons évalué la sensibilité de la technique en faisant varier la concentration du SYBR-Safe dans les différents échantillons. En dernier point, les tampons de sélection des aptamères modèles ont été testés. Ces tampons correspondent à ceux décrits dans la littérature et dans lesquels les aptamères ont été isolés durant les SELEX. Le tableau 3.11 décrit la composition de ces tampons.

Tableau 3.11 : Composition des tampons de sélection des aptamères modèles.

Aptamère	Tampon	Références
ATP	20mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 5mM MgCl ₂ , 10mM KCl	(Szostak <i>et al.</i> , 1995)
L-Arg	100mM NaCl, 10mM Tampon TE pH7.4	(Harada <i>et al.</i> , 1995)
Ethanolamine	100mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH7.5, 2mM MgCl ₂ , 1mM CaCl ₂ , 0.02% Tween20	(Mann <i>et al.</i> , 2005)

Légende : Tampon TE (10mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA)

- Quantification de la liaison des aptamères à leurs ligands par fluorométrie :

La manipulation vise à quantifier la fluorescence émise par l'intercalation du SYBR Safe dans les aptamères selon la conformation des aptamères. Il serait théoriquement possible de calculer la K_D en faisant varier la concentration du ligand jusqu'à saturation des aptamères. Pour le calcul de la constante de dissociation, 1 μ M d'aptamère froid est saturé avec des concentrations de ligands 10 fois supérieures et inférieures à la K_D décrite dans la littérature. Le tout est resuspendu dans une solution de 100 μ L de volume final. La dilution se fait dans le SYBR-Safe concentré 10x et le tampon de liaison correspondant à chaque aptamère (tableau 3.11). Ceci permet de générer des courbes sigmoïdales représentative de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration du ligand. Avec les concentrations choisies, deux plateaux devraient apparaître aux extrémités de la courbe correspondant à la saturation des aptamères avec leurs ligands respectifs. La figure 3.9 décrit la répartition des échantillons utilisés pour l'estimation de la K_D avec la fluorométrie.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Apt1+10mM ATP	Apt1+1mM ATP	Apt1+100 μ M ATP	Apt1+10 μ M ATP	Apt1+1 μ M ATP	Apt1+100nM ATP	Apt1+10nM ATP	Vide	Apt2+250mM Arg	Apt2+25mM Arg	Apt2+2.5mM Arg	Apt2+250 μ M Arg
B	Apt2+25 μ M Arg	Apt2+2.5 μ M Arg	Apt2+250nM Arg	Apt2+25nM Arg	Vide	Apt3+10mM EthNH ₂	Apt3+1mM EthNH ₂	Apt3+100 μ M EthNH ₂	Apt3+10 μ M EthNH ₂	Apt3+1 μ M EthNH ₂	Apt3+100nM EthNH ₂	Apt3+10nM EthNH ₂
C	Apt1+T1	Apt2+T2	Apt3+T3	SYBR10X	H ₂ O							

Figure 3.9 : Répartition des échantillons sur les 3 premières lignes de la plaque 96 puits de fluorométrie pour la quantification de la K_D . Le SYBR-Safe est concentré à 10x pour tous les échantillons. (Apt1) : aptamère ATP, (Apt2) : aptamère L-Arg, (Apt3) : aptamère éthanolamine, (Arg) : L-arginine, (EthNH₂) : éthanolamine,

(T1) : tampon 1 de l'aptamère ATP, (T2) : tampon 2 de l'aptamère L-Arg, (T3) : tampon 3 de l'aptamère éthanolamine, (cases vertes) : contrôles négatifs, (cases jaunes) : vides.

Les données générées par la fluorométrie sont transférées dans le logiciel GraphPad Prism 6. Ce logiciel permet de calculer les K_D grâce à des modèles d'équations de liaison prédéfinies. L'équation mathématique pour le calcul de la K_D de l'aptamère L-Arg et éthanolamine est :

$$Y = B_{max} * X / (K_d + X)$$

Cette équation permet de déterminer la constante de dissociation à partir de la concentration du ligand « X », la liaison spécifique « Y » et du signal fluorescent le plus haut traduisant la capacité maximale de liaison « B_{max} ». Pour l'aptamère ATP, l'équation utilisée est :

$$\begin{aligned} Site1 &= B_{maxHi} * X / (K_{dHi} + X) \\ Site2 &= B_{maxLo} * X / (K_{dLo} + X) \\ Y &= Site1 + Site2 \end{aligned}$$

Cette équation permet d'estimer la K_D du ligand en utilisant la somme de la liaison spécifique des deux sites de liaison présumés de l'aptamère ATP avec les mêmes paramètres décrits plus haut.

3.3.3. Analyse de la liaison par dialyse à l'équilibre :

La dialyse à l'équilibre est une technique qui se base sur la propriété de diffusion des molécules à travers une membrane selon leur poids moléculaire. Un dispositif à dialyse est constitué de deux compartiments séparés par une membrane avec un seuil de diffusion connu. La figure 3.10 présente le dispositif utilisé dans les travaux qui suivent.



Figure 3.10 : Dispositif de dialyse « Dispo Equilibrium Dialyzer » de Harvard Apparatus (Massachusetts, USA).

Les deux compartiments du dispositif acceptent des volumes allant de 25µL à 75µL. Le seuil de diffusion choisi dans la suite des travaux est de 5kDa.

Le principe de la dialyse à l'équilibre est applicable à un besoin d'évaluation de la liaison d'aptamères à leurs ligands. Dans ce cadre, il est possible d'observer le passage des ligands radiomarqués du compartiment A d'origine vers le compartiment B contenant l'aptamère. La liaison du ligand à son aptamère permet de faire migrer la radioactivité détectée du compartiment A à t=0 vers le compartiment B à t=équilibre. Dans le cas d'absence de liaison, la radioactivité s'équilibre entre les deux compartiments A et B à t=équilibre. La figure 3.11 schématise les deux résultats possibles pour une dialyse à l'équilibre.

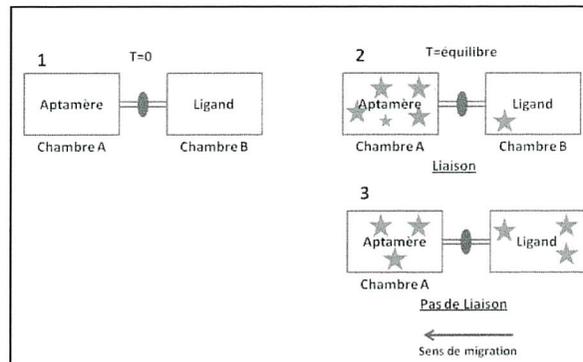


Figure 3.11 : Schématisation de la migration du ligand radioactif dans une expérience de dialyse à l'équilibre. (1) : à t=0 la radioactivité est localisée dans la chambre du ligand. (2) : en cas de liaison, la radioactivité sera sensiblement plus abondante dans la chambre de l'aptamère à l'équilibre. (3) : en cas de non liaison, la quantité de radioactivité entre les chambres sera équivalente à l'équilibre. (ovale rouge) : membrane, (étoile verte) : ligand radiomarqué.

Les essais de dialyse à l'équilibre ont été entrepris avec l'aptamère liant l'ATP. Sa taille moléculaire est de 13kDa ce qui l'empêche de diffuser à travers la membrane. Ceci n'est pas le cas de l'ATP qui peut diffuser puisque son poids moléculaire est de 0,5kDa.

- Estimation de l'affinité de l'aptamère de l'ATP à son ligand :

Afin d'évaluer l'affinité de l'aptamère de l'ATP pour son ligand, des essais de saturation dans des chambres de dialyse ont été entrepris. Pour ce faire, la concentration d'ATP froide mélangée avec de l'ATP radioactive ($\gamma\text{AT}^{32}\text{P}$) est variée dans la chambre B en gardant la même concentration d'aptamère dans la chambre

A. La concentration de l'aptamère est de 10 μ M. Les deux éléments sont dilués dans une solution de MgCl₂ à 200mM dans un volume final de 50 μ L.

Une fois les chambres chargées, les dispositifs sont mis sous faible agitation à température ambiante pendant 24h jusqu'à atteinte de l'équilibre. A t=équilibre, 10 μ L sont prélevés de chaque chambre de dialyse et disposés sur un papier filtre Whatman (Sigma Aldrich, USA) dûment identifié avec la provenance de chaque volume (chambre A ou B, concentration du ligand). Le papier filtre Whatman est par la suite couvert par deux couches de papier cellophane et mis à exposer sur une cassette radiologique avant de révéler le résultat au Typhoon FLA9500.

- Essai de compétition par dialyse à l'équilibre :

Des essais de compétitions ont également été entrepris. Ces essais impliquent l'utilisation d'oligonucléotides de longueurs différentes et qui sont parfaitement complémentaires au site de liaison de l'ATP sur la séquence de l'aptamère. Si un oligonucléotide est hybridé sur le site de liaison, l'ATP est théoriquement capable de l'expulser du site de liaison pour s'y encastrer elle-même. Se basant sur cette hypothèse, trois oligonucléotides de tailles différentes ont été utilisés pour tester la compétitivité de l'ATP pour son site de liaison. Afin d'évaluer la faisabilité de la technique avec des chambres de dialyse, un test de diffusion simple avec des oligonucléotides marqués au ³²P a été fait. Ceci permettrait de confirmer que les oligonucléotides sont capables de diffuser à travers la membrane qui sépare les deux chambres de dialyse pour aller s'hybrider à la séquence complémentaire dans la chambre des aptamères. Les trois oligonucléotides sont parfaitement complémentaires à la séquence de poche de liaison de l'ATP sur l'aptamère et leur poids moléculaire est inférieur à la limite de diffusion de la membrane. Le tableau 3.12 décrit les séquences choisies et leur complémentarité à l'aptamère ATP.

Tableau 3.12 : Oligonucléotides compétiteurs du site de liaison de l'ATP sur l'aptamère.

Oligonucléotides		Caractéristiques
	Séquence 5'- 3'	
Oligo 1	CTCCCCCAGGT	11 nucléotides, Tm 43°C, PM: 3kDa
Oligo 2	CCCAGGT	7 nucléotides , Tm <25°C, PM: 2kDa
Oligo 3	CCCAGG	6 nucléotides, Tm <25°C, PM: 1,7kDa
Complémentarité de l'oligonucléotide à l'aptamère		
Oligo 1	CCTGCCACGCTCCGCTACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT	
Oligo 2	CCTGCCACGCTCCGCTACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT	
Oligo 3	CCTGCCACGCTCCGCTACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT	

Légende : Tm : température de fusion, PM : poids moléculaire, les bases en rouge correspondent aux régions de complémentarité entre les oligonucléotides et l'aptamère.

Pour les tests en chambre de dialyse, la procédure est semblable à celle décrite plus haut avec le ligand. Néanmoins, une concentration fixe d'oligonucléotides froids est ajoutée à 1000cpm d'oligonucléotides radiomarqués.

Les chambres de dialyse sont déposées sur un agitateur en agitation douce jusqu'à t=équilibre (pendant 24 heures). Pour visualiser le résultat, la procédure est la même que celle décrite plus haut.

3.3.4 : Analyse de la structure par méthylation à site spécifique par le DiméthylSulfate (DMS) :

Le principe de ce protocole repose sur la génération de profils différentiels de dégradation d'aptamères méthylés sur des sites spécifiques selon la présence ou l'absence du ligand ou d'un oligonucléotide compétiteur (Sun *et al.*, 2010). Le DMS (Sigma Aldrich, USA) permet la méthylation des guanines de l'ADN en position N7. Le repliement des aptamères en présence ou absence de leurs ligands étant différents, la disponibilité des N7 des guanines n'est pas la même et en conséquence

la méthylation par le DMS est affectée. Par la suite, des traitements à l'acide formique 88% (AF) et à la pipéridine 99% (Pip) (Sigma Aldrich, USA) permettent de dégrader les aptamères de manière spécifique aux sites de purines méthylés. Finalement, pour révéler les profils différentiels, les ADN dégradés sont mis à migrer dans un gel dPAGE. La figure 3.12 présente la position de méthylation des guanines ainsi que les structures du DMS, de l'AF et de la Pip.

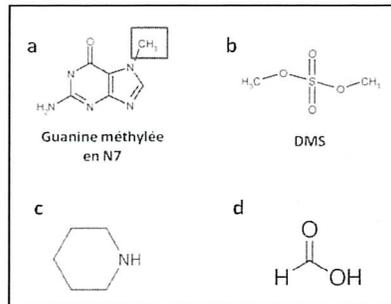


Figure 3.12 : Composés utilisés pour la dégradation méthyl-dépendante de l'ADN. (a) Position de méthylation de la guanine, (b) structure du DMS , (c) de la pipéridine et (d) de l'acide formique. (Adapté (Brewer *et al.*, 1990, Sun *et al.*, 2010)).

L'aptamère de l'ATP a été utilisé pour la mise en place et l'optimisation du protocole. La mise au point du protocole se fait en vérifiant que des modifications sont détectables au niveau des profils différentiels en présence ou absence du ligand ou de l'oligonucléotide compétiteur. Dans une réaction typique, l'aptamère radiomarqué (1000 cpm) et l'aptamère froid (10 μ M) sont mis en présence d'une concentration saturante d'ATP (100 μ M) ou d'une concentration équivalente d'oligonucléotide compétiteur (10 μ M). Le tampon de méthylation ne devant pas contenir de Tris-HCl, le tampon de sélection de l'aptamère ATP n'est pas utilisable. Plusieurs tampons de méthylation ont donc été testés. Les tampons et solutions testés sont :

- Tampon sodium cacodylate 300mM
- Solution MgCl₂ 1mM
- Solutions NiCl ou KCl ou NaCl 150mM

Plusieurs autres paramètres ont été testés à savoir :

- Le temps de méthylation : 30 secondes, 2 minutes, 8 minutes
- La concentration du DMS : 0.1%, 0.3%, 1%, 2%, 3%

Le protocole complet est décrit dans le tableau 3.13.

Tableau 3.13 : Protocole de l'analyse structurale de l'aptamère d'ATP par méthylation différentielle.

Étape	Description	Matériel
Radiomarquage de l'aptamère	Décrit au Tableau 3.7	Décrit au Tableau 3.7
Méthylation des guanines	<p><u>Méthylation</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Chauffer les échantillons d'aptamères (+/- ligand ou oligonucléotide) à 95°C pendant 5 minutes - Refroidir jusqu'à 25°C - Traiter avec 1µL de DMS - Arrêter la réaction avec une solution <i>Stop</i> - Ajouter 2.5v d'EtOH 100% et précipiter à -20°C pendant 1heure <p><u>Précipitation</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Centrifuger 20 minutes à 14000rpm, jeter le surnageant - Ajouter 100µL d'EtOH 70%, centrifuger 20 minutes à 14000rpm, jeter le surnageant et laisser sécher 20 minutes. 	<p><i>Solution DMS Stop :</i> 1M Tris HCl pH 7.5, 0.1M EDTA pH 8, 1M Betamercaptoéthanol</p>
Clivage aux sites méthylés	<p><u>Dépurination par l'AF</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Resuspendre les réactions séchées dans 20µL de H₂O - Ajouter 20µL d'AF, laisser agir pendant 20 minutes à température ambiante - Ajouter 0.1v de NaOAc 3M et 2.5v d'EtOH 100%. Précipiter comme 	

	<p>décrit plus haut.</p> <p><u>Clivage à la pipéridine</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Suspendre le culot dans 70µL de Pip - Chauffer à 90°C pendant 30 minutes - Jeter le surnageant de pipéridine et sécher le culot 3 fois au Speedvac (ThermoFisher Scientific, USA) en le resuspendant à chaque fois dans 20µL d'H₂O - Resuspendre dans 20µL de bleu de migration dénaturant 2X 	
Profils différentiels	Gel dPAGE décrit en 3.2.2	

Après migration des échantillons et séparation des fragments méthylés et dégradés, le gel est démonté et exposé à une cassette radiologique comme décrit précédemment. Le résultat du gel est scanné au Typhoon FLA9500.

4. RÉSULTATS:

4.1. Développement d'un biosenseur pour la détection de virus d'intérêt :

4.1.1. Test de détection d'une hybridation simple sur lame de verre :

Dans un premier temps, la possibilité de détecter un évènement d'hybridation simple a été testée. Pour ce faire, une séquence de capture et une sonde qui correspondent aux séquences de détection de l'ADN de SEBOV ont été testées (décrites dans le tableau 3.6). Le design de l'expérience est décrit dans la figure 4.1 et la disposition des échantillons sur les lames de verre est décrite dans la figure 4.2.

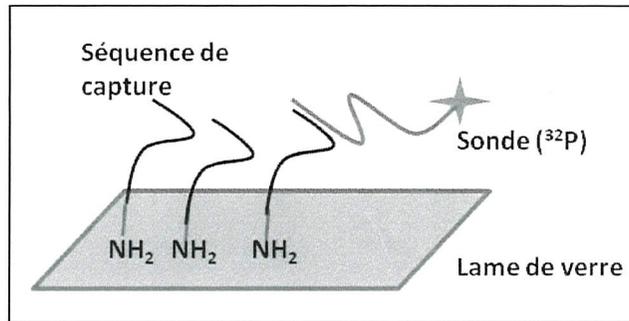


Figure 4.1 : Essai de détection de l'hybridation simple entre deux séquences complémentaires. La lame de verre est fonctionnalisée avec les séquences de capture. Les sondes sont radiomarquées et complémentaires aux séquences de capture. (rouge) : spacer 10 adénines, (étoile verte) : radiomarquage ³²P.

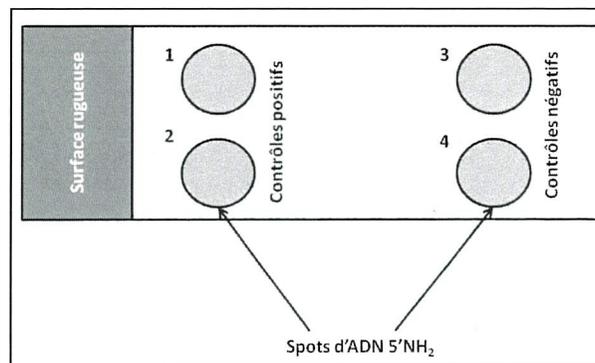
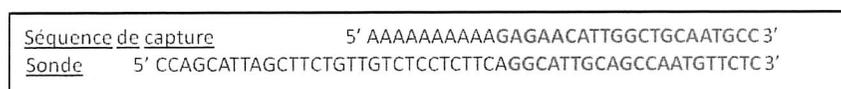


Figure 4.2 : Disposition des essais d'hybridation sur une lame de verre pour la détection d'une hybridation simple. (1) et (2) : séquence de capture et sonde du virus SEBOV en duplicata, (3) : Séquence de capture de SEBOV et sonde non complémentaire, (4) : H₂O.

Les deux séquences choisies (capture et sonde) pour l'essai d'hybridation simple ont été dessinées pour la détection de SEBOV et aussi de manière à s'hybrider l'une sur l'autre. Les régions de complémentarité sont montrées dans le schéma suivant.



Les régions rouges correspondent à la complémentarité entre les deux séquences. La sonde radiomarquée a effectivement permis de détecter un signal d'hybridation spécifiquement sur les spots où la séquence de capture a été déposée comme le montre la figure 4.3.

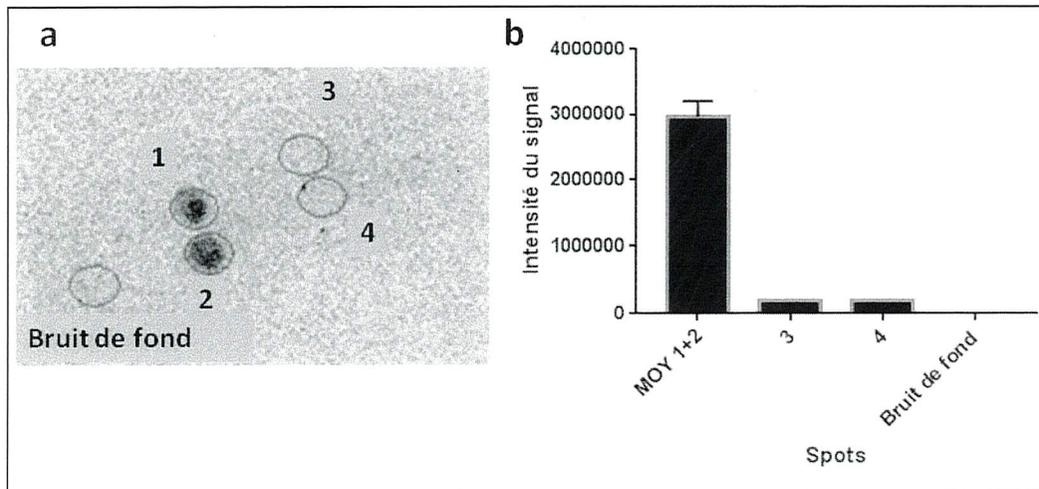


Figure 4.3 : Essai d'hybridation simple de la séquence de capture et la sonde spécifiques de la détection du virus SEBOV sur lame de verre silanisée. (a) : résultats de l'hybridation de sondes sur une lame de verre silanisée. Les spots (de 1 à 4) sont décrits dans la figure 4.2, (b) : intensités des signaux radioactifs au niveau des spots d'hybridation, (MOY 1+2) : moyenne d'intensité des spots 1 et 2.

Comme le montre la figure, la radioactivité est plus intense au niveau des spots 1 et 2 alors qu'elle est proche du bruit de fond au niveau des spots 3 et 4.

Les intensités de la radioactivité des spots sont analysées par les logiciels ImageQuant et GraphPad Prism 6. L'histogramme confirme les données visuelles du scan des lames silanisées. En effet l'intensité est plus abondante au niveau des spots 1 et 2 correspondant à l'hybridation de la séquence de capture et de la sonde de SEBOV.

4.1.2. Test de détection d'une hybridation en sandwich sur lame de verre :

Dans un second temps, un essai d'hybridation en sandwich a été mené en utilisant la séquence de capture et la sonde dessinées pour la détection de l'ARN de VIH-1 (tableau 3.6). Le protocole mis en place utilise une séquence de capture complémentaire à une région A sur l'ARN de VIH-1. Une première hybridation a donc lieu entre ces deux dernières. Ensuite, la sonde radiomarquée s'hybride sur une région B de l'ARN et permet la détection de l'ensemble des événements d'hybridation. Le design expérimental est décrit dans la figure 4.4 et le schéma de la figure 4.5 montre la disposition sur la lame des différents modèles d'essais d'hybridation.

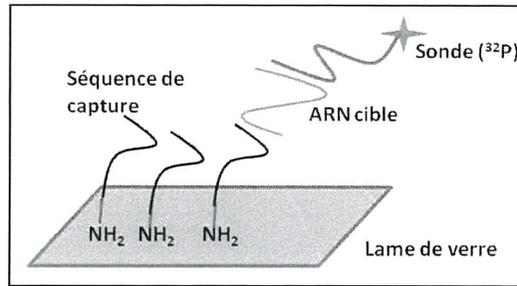


Figure 4.4 : Essai de détection de l'ARN cible par double hybridation. La lame de verre est fonctionnalisée avec des séquences de capture complémentaires à une région 1 de l'ARN cible. La sonde radiomarquée est complémentaire à une région 2. (rouge) : spacer 10 adénines, (étoile verte) : radiomarquage ^{32}P .

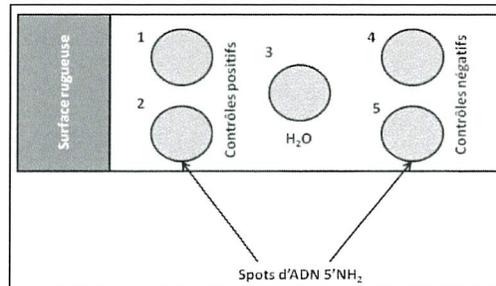


Figure 4.5 : Disposition des essais d'hybridation sur une lame de verre pour la détection en sandwich de l'ARN du VIH-1.

Pour faciliter la compréhension de la disposition des éléments des différents spots, ceux-ci sont résumés dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 : Composition des spots d'essais d'hybridation en sandwich pour la détection de l'ARN du VIH-1

Spot	Séquence de capture	ARN	Sonde radiomarquée
1	VIH-1	VIH-1	VIH-1
2	VIH-1	VIH-1	VIH-1
3	H ₂ O	-	-
4	Non complémentaire	VIH-1	VIH-1
5	Non complémentaire	VIH-1	Non complémentaire

Les spots (1) et (2) correspondent à l'évènement d'hybridation d'intérêt où l'intensité de radioactivité sera théoriquement la plus importante. Le spot (3) ne contenant aucun ADN attaché ne devrait pas présenter de signal. De même, le spot (4) ne présente pas d'hybridation entre l'ARN d'intérêt et la séquence de capture puisque celle-ci ne lui est pas complémentaire. De fait, l'ARN a été élué lors du lavage séparant les deux hybridations. Ainsi la deuxième hybridation n'a pas eu lieu d'où l'absence présumée du signal. Quant au spot (5), l'ARN d'intérêt n'est pas fixé sur la séquence de capture puisqu'elle ne lui est pas complémentaire. De même manière, la sonde de détection n'est pas complémentaire et a été éluée lors du lavage avant l'exposition.

Lors de l'application du protocole, la transcription de l'ARN VIH-1 n'a pas été réussie. Plusieurs essais de transcription à partir de PCR d'assemblage réussies n'ont pas donné le fragment d'intérêt. L'essai d'hybridation sur l'ARN n'a donc pas pu être mené. Le choix de deux virus modèles a été fait pour justement prévenir et en prévision des difficultés liées à la transcription *in vitro* de longs fragments d'ARN. Dans le cas du fragment représentatif du VIH-1, aucune hypothèse plausible ne peut être émise quant à l'impossibilité de la transcription. Nous avons essayé dans un deuxième temps de produire l'ARN du virus SEBOV pour conduire les essais d'hybridation sandwich. Malheureusement, la difficulté se manifeste bien avant la transcription. L'assemblage de l'ADN matrice en lui-même est problématique. Ceci peut être relié à la polarité de l'ARN (négatif) et donc à la position de la séquence amorce T7 de l'ARN polymérase ajoutée en 3' de la dernière séquence reverse (tableau 3.2).

Finalement, un dernier test d'hybridation en sandwich a été entrepris en utilisant des sondes couplées à des AuNP. Pour ce faire, la séquence de capture correspondant à la détection du virus SEBOV a été attachée sur la surface de verre. La sonde complémentaire modifiée par un groupement SH en 3' a été couplée sur la AuNP. La séquence représentative de SEBOV a été substituée par une séquence sandwich également avec des régions complémentaires aux deux séquences (capture et sonde). Cette substitution a pour but d'évaluer la faisabilité du modèle d'hybridation avant d'entreprendre des essais de détection d'ARN viral. Le modèle d'essai de l'hybridation est présenté dans la précédente figure 4.4 et la composition de chaque spot est expliquée dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2 : Composition des spots d'essais d'hybridation en sandwich pour la détection d'une séquence représentative de l'ARN de SEBOV avec une sonde couplée à une AuNP.

Spot	Séquence de capture	Séquence 2	Sonde-AuNP
1	SEBOV	SEBOV	Non complémentaire
2	SEBOV	SEBOV	SEBOV
3	H2O	-	SEBOV
4	Non complémentaire	SEBOV	SEBOV
5	Non complémentaire	SEBOV	SEBOV

Dans le cas de l'essai avec les sondes couplées aux AuNP, le seul spot présentant un signal radioactif sera le (2). Ce signal radioactif est représentatif de l'hybridation du complexe sonde-AuNP sur la séquence sandwich, elle-même hybridée sur la séquence de capture. Le résultat du test d'hybridation en sandwich est représenté dans la figure 4.6.

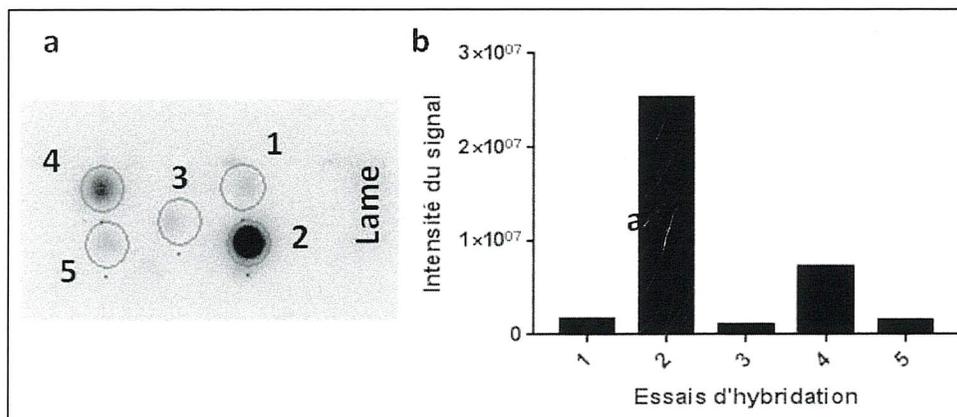


Figure 4.6 : Essai d'hybridation en sandwich de séquences SEBOV avec des sondes radiomarquées couplées à des AuNP. (a) : Résultat de l'hybridation des séquences sur la lame, (b) : Histogramme des intensités des spots sur la lame fonctionnalisée, les spots de 1 à 5 correspondent aux essais décrits dans le tableau 4.2.

Comme attendu, le spot 2 présente la plus importante intensité relative de radioactivité. Ceci traduit l'évènement de liaison produit entre les sondes radiomarquées et couplées aux AuNP. Ce signal est absent au niveau des spots ne présentant pas de complémentarité entre les séquences utilisées. Les intensités des spots sont analysées par le logiciel GraphPad Prism 6 pour générer l'histogramme d'intensités.

Dans les essais présentés ici, il a été possible d'obtenir des évènements d'hybridation de séquences complémentaires sur des lames de verres. Ces évènements sont traduits par la présence de radioactivité sur les spots où l'hybridation est possible. De plus, il a aussi été possible d'utiliser des sondes oligonucléotidiques conjugués aux AuNP.

4.2. : Mise en place de protocoles pour évaluer l'interaction entre des aptamères d'ADN et leurs ligands :

Avant d'utiliser les aptamères ADN comme molécules de reconnaissance pour le développement de biosenseurs, une caractérisation rigoureuse et complète doit être effectuée. Cette étape permet de résoudre, d'un côté, la structure de l'aptamère et donc son repliement. D'un autre côté, il est nécessaire d'élucider les caractéristiques thermodynamiques et surtout l'affinité de l'aptamère à son ligand potentiel. Pour ce faire, nous avons mis en place sept protocoles d'analyse structurale et de la liaison de l'aptamère à son ligand. Nous vous présentons ici quatre protocoles ayant généré les résultats les plus probants.

4.2.1 : Analyse de la liaison par Shifted Reverse-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SR-PAGE) :

Deux essais ont été réalisés pour l'évaluation de la technique SR-PAGE pour l'analyse de la liaison des aptamères avec leurs ligands.

La figure 4.7 schématise les étapes d'un protocole complet SR-PAGE.

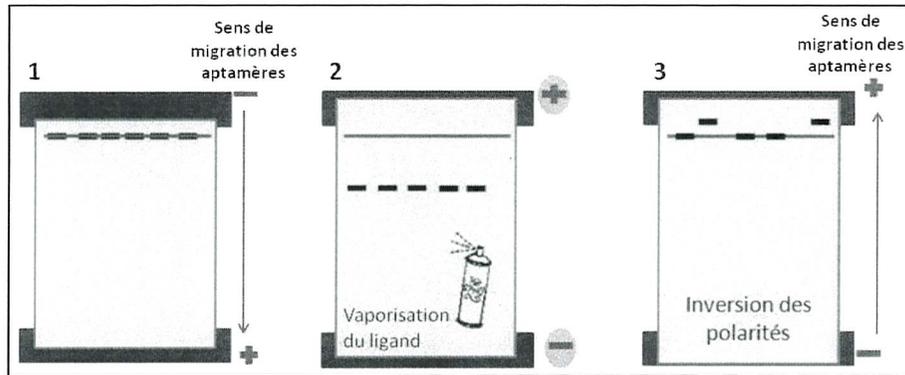


Figure 4.7 : Étapes d'un protocole SR-PAGE pour la sélection d'aptamères. (1) : Les bibliothèques sont migrées du haut vers le bas du gel. (2) : le ligand est vaporisé en concentration saturante directement sur le gel. (3) : les aptamères sont remis à migrer du bas vers le haut. Les aptamères ayant lié le ligand se replient et gagnent en vitesse et dépassent la ligne des puits.

Premièrement, la concentration des aptamères a été variée pour analyser la sensibilité de la technique à un pool d'aptamères uniques. Pour ce faire, la concentration d'aptamère froid a été variée (100, 250 et 500 μ M) pour une quantité trace constante d'aptamère radiomarqué (1000cpm). La population d'aptamères ayant lié l'ATP dans le gel dépassera la ligne des puits. Les aptamères n'ayant pas lié l'ATP garderont leur structure native et retourneront au point initial. La figure 4.8 présente le résultat de liaison des aptamères dans ce premier gel.

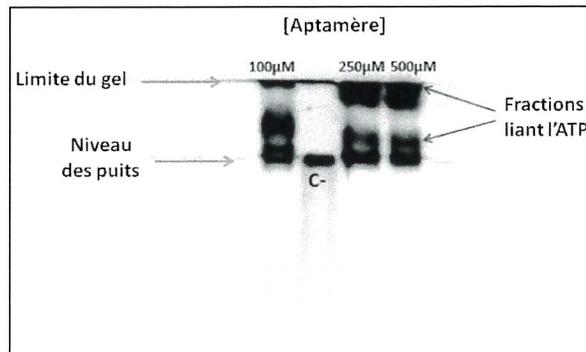


Figure 4.8 : Fractions d'aptamères ayant lié l'ATP dans un gel SR-PAGE. (C-) : fragment ADN de 40 nucléotides contrôle négatif.

Comme constaté dans le gel, les différentes concentrations d'aptamère présentent toutes des bandes au-dessus du niveau des puits. Celles-ci correspondent aux fractions de la population d'ADN migrées ayant lié l'ATP. Les trois bandes sont

présentes dans les puits de l'aptamère ATP, mais sont absentes dans le puits du contrôle négatif (fragment ADN de 40 nucléotides).

Néanmoins, aucun contrôle négatif n'est disponible pour la structure native de l'aptamère ATP en lui-même. Pour pallier à ce problème et confirmer la pertinence de la bande ayant lié l'ATP, deux gels ont été utilisés. Un premier contient l'aptamère ATP et l'aptamère TPP. Ce premier gel subi une saturation avec 5mM d'ATP. Le second gel quant à lui contient les deux aptamères cités précédemment mais est saturé avec 100µM de TPP. Ces deux gels, migrés en même temps, dans les mêmes conditions, fournissent pour chacun des aptamères utilisés, un contrôle négatif (structure originale dans le gel saturé avec le ligand non spécifique) et une structure liée (dans le gel saturé avec le ligand spécifique). La figure 4.9 présente le résultat de ces deux gels.

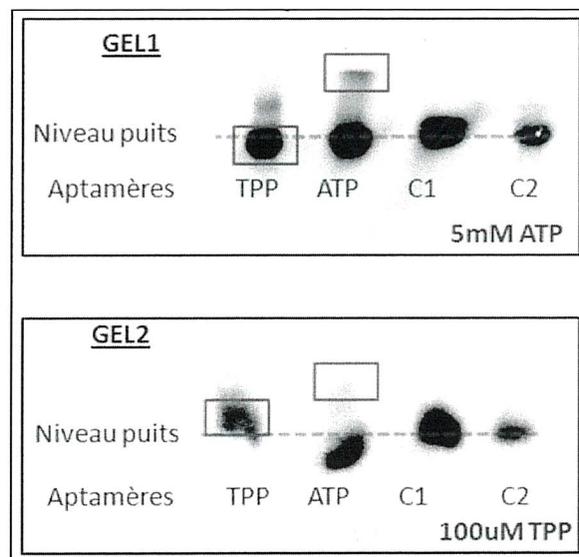


Figure 4.9 : Comparaison des structures natives et liées de l'aptamère ATP et TPP avec deux gels SR-PAGE. (C1) : fragment ADN de 43 nucléotides comme contrôle négatif, (C2) : fragment ARN de 100 nucléotides comme contrôle négatif.

Dans le puits de l'aptamère TPP, un retour au point de départ est constaté lorsque le gel est saturé avec 5mM d'ATP. L'aptamère TPP n'étant pas spécifique à l'ATP ne se replie pas et ne gagne donc pas en vitesse pour dépasser la ligne des puits. Par contre, lorsque le gel est saturé avec 100µM de TPP, l'aptamère se replie, sa migration devient plus rapide et donc dépasse la ligne des puits lors de la deuxième migration. Inversement, l'aptamère de l'ATP se replie au contact de son ligand dans le premier gel. Il en résulte l'apparition d'une fraction liée au-dessus de la ligne du

puits. Cette fraction est absente dans le deuxième gel lorsque les aptamères sont saturés avec 100µM de TPP. La procédure est confirmée par les deux contrôles négatifs (un brin ADN non spécifique de 43 nucléotides (C1) et un brin ARN non spécifique de 100 nucléotides (C2)). Ces résultats confirment la possibilité d'utiliser le protocole SR-PAGE pour sonder les changements structuraux des aptamères suite à la liaison à leur ligand spécifique.

4.2.2. Analyse de la liaison par fluorométrie :

Afin d'évaluer la possibilité d'utilisation de la molécule SYBR-Safe pour quantifier la liaison d'aptamères à leurs ligands spécifiques, un premier essai a été conduit en utilisant deux types d'ADN (ADNdb et ADNsb). Les deux types d'ADN ont été mis en solution avec différentes concentrations de SYBR-Safe et dans les trois tampons spécifiques des trois aptamères utilisés (liant ATP, L-Arg et éthanolamine).

Dans chaque puits de la plaque, les trois paramètres testés (concentration SYBR Safe, ADN et tampon) sont variés dans un volume final de 100µL. Les échantillons sont préparés et disposés selon le schéma présenté dans la figure 4.10.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SYBR 100x T1	SYBR 10X T1	SYBR 1X T1	SYBR 100X ADNsb T1	SYBR 10X ADNsb T1	SYBR 1X ADNsb T1	SYBR 100X ADNdb T1	SYBR 10X ADNdb T1	SYBR 1X ADNdb T1	Vide	SYBR 100X T2	SYBR 10X T2
B	SYBR 1X T2	SYBR 100X ADNsb T2	SYBR10X ADNsb T2	SYBR 1X ADNsb T2	SYBR 100X ADNdb T2	SYBR 1X ADNdb T2	Vide	SYBR 100X T3	SYBR10X T3	SYBR 1X T3	SYBR 100X ADNsb T3	SYBR 10X ADNsb T3
C	SYBR 1X ADNsb T3	SYBR 100X ADNdb T3	SYBR 10X ADNdb T3	SYBR 1X ADNdb T3	Vide	T1	T2	T3	0	0	0	0

Figure 4.10 : Répartition des échantillons dans une plaque 96 puits pour l'essai de fluorométrie. (SYBR) : concentration du SYBR-Safe, (T1) : tampon de l'aptamère ATP, (T2) : tampon de l'aptamère L-Arg, (T3) : tampon de l'aptamère de l'éthanolamine, (ADNdb) : produit PCR de 50 paires de bases, (ADNsb) : séquence de 47 nucléotides, (cases jaunes) : vides.

L'analyse de la fluorescence a été effectuée pour des longueurs d'ondes d'excitation variant de 280nm à 510nm (longueur d'onde d'émission fixe à 530nm). Ceci a permis de déterminer la longueur d'onde d'excitation optimale. Les résultats de ce premier essai ont démontré que la longueur d'onde d'excitation optimale est de 500nm (contre 502nm décrite dans le manuel du manufacturier). D'autre part la concentration de SYBR-Safe optimale pour une intercalation différentielle entre les ADNdb et ADNsb est de 10x. La figure 4.11 présente l'histogramme d'intensité de fluorescence du SYBR-Safe selon la structure de l'ADN.

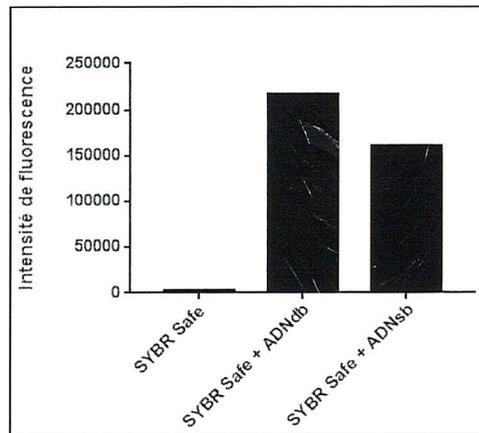


Figure 4.11 : Fluorescence due à l'intercalation du SYBR-Safe dans l'ADN. SYBR Safe avec le tampon d'hybridation, l'ADNdb ou l'ADNsb.

Comme le démontre la figure ci-dessus, l'intercalation du SYBR-Safe est plus importante quand l'ADN est double brin. La fluorescence relative du SYBR-Safe seul est proche du bruit de fond. D'autre part, les trois tampons spécifiques des trois aptamères utilisés dans ces essais ne présentent pas d'interférence comparativement à des contrôles négatifs de tampons seuls (données non présentées).

Dans un second temps, des quantifications de fluorescence en présence de concentrations croissantes de ligands spécifiques aux trois aptamères ont été effectuées. Ces essais ont pour but de générer des courbes de saturation de type sigmoïdales à partir desquelles la K_D pourrait être calculée. Si les K_D calculées sont proches de celles calculées de la littérature, la technique serait donc validée. Les données recueillies ont été analysées selon des modèles de régression non linéaire pour des événements de saturation complète d'un site de liaison pour l'aptamère de L-Arg et éthanolamine, et pour plusieurs sites de liaison probables pour l'aptamère ATP. La figure 4.12 présente les trois profils de saturation des aptamères modèles.

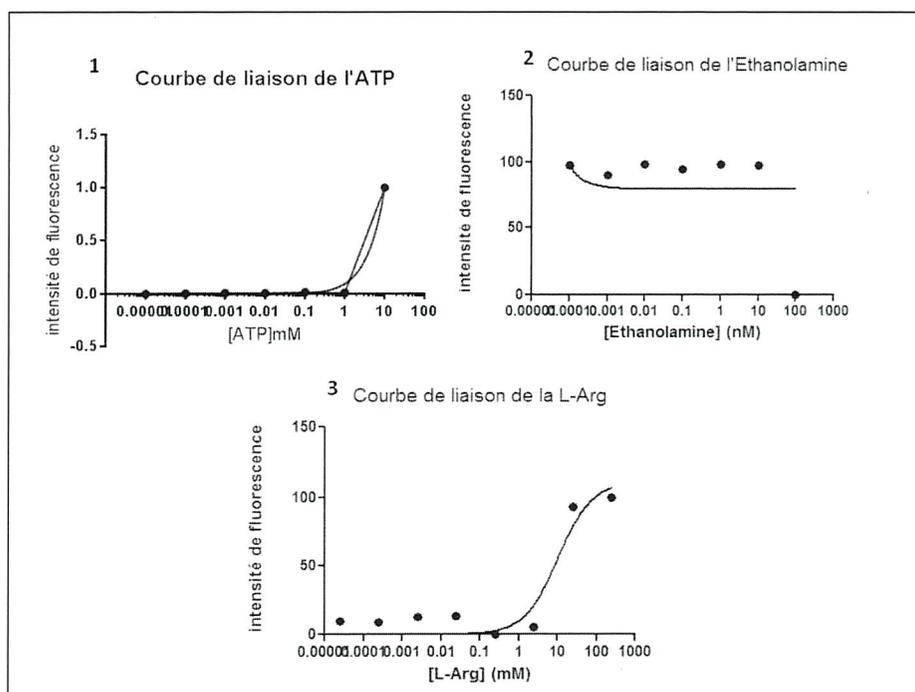


Figure 4.12 : Détection par fluorescence SYBR-Safe de la liaison à leur ligand des 3 aptamères modèles. (1) : courbe de liaison de l'aptamère de l'ATP, (2) : courbe de saturation de la liaison de l'aptamère de l'éthanolamine, (3) : courbe de saturation de l'aptamère de la L-Arg.

Les courbes de liaison obtenues suite à l'analyse par fluorométrie de la saturation des différents aptamères modèles ne présentent pas toutes les formes sigmoïdales recherchées. En effet, le résultat le plus probant concerne l'aptamère de la L-Arg (figure 4.12, courbe 3). La K_D calculée est de 10,23mM contre 2,5mM reporté dans la littérature (intervalle de confiance de [-5,893 ; +26,34] à 95%). La K_D calculée pour l'aptamère de l'ATP est de 2,7 μ M contre 10 μ M reporté dans la littérature. La courbe obtenue pour cet aptamère est d'ébauche sigmoïdale mais manque le plateau de saturation final. Néanmoins, l'intervalle de confiance à 95% n'est pas calculé et reporté comme « trop large » selon le logiciel. Finalement, pour l'aptamère de l'éthanolamine, aucune K_D concrète n'a pu être calculée.

4.2.3. Analyse de la liaison par dialyse à l'équilibre :

La dialyse à l'équilibre a servi à observer l'affinité de l'aptamère pour son ligand ATP sous forme d'évènements de diffusion. Dans un premier temps, une variation de l'ATP (radioactive et froide) a permis la saturation d'une concentration fixe de l'aptamère. Le tableau 4.3 décrit la composition des solutions dans les chambres de dialyse de part et d'autre de la membrane.

Tableau 4.3 : Composition des solutions dans les chambres à dialyse.

Chambre A: Aptamère	
	Concentration finale
Aptamère	10 μ M
MgCl ₂	200mM
H ₂ O	Jusqu'à 50 μ L
Chambre B: Ligand ATP	
ATP froide	Entre 50 μ M et 3mM
γ AT ³² P	1000cpm
MgCl ₂	200mM
H ₂ O	Jusqu'à 50 μ L

La figure 4.13 montre les résultats pour 75 μ M d'aptamère froid saturés par des concentrations croissantes d'ATP (décrit dans le tableau 4.3).

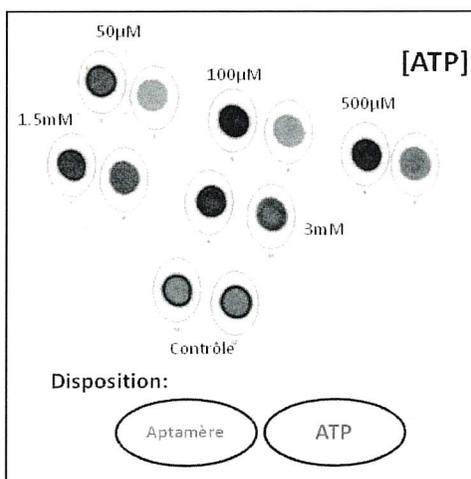


Figure 4.13 : Saturation de l'aptamère ATP par son ligand après 24h par dialyse à l'équilibre. Les concentrations d'ATP utilisées sont indiquées dans la figure pour chaque paire de spots, c'est-à-dire pour chaque dispositif à dialyse.

A $t=0$, la radioactivité était localisée dans la chambre de l'ATP (à droite). Après 24h, à l'équilibre, la radioactivité (le ligand) est relocalisée dans la chambre de l'aptamère. Lorsque des concentrations d'ATP de 50, 100 et 500 μ M sont utilisées, l'intensité relative de radioactivité est plus importante dans la chambre contenant l'aptamère. A des concentrations plus élevées, la distribution préférentielle est moins prononcée et l'équilibre s'installe entre les deux chambres. Les données présentées plus haut sont traduites par un histogramme décrit dans la figure 4.14.

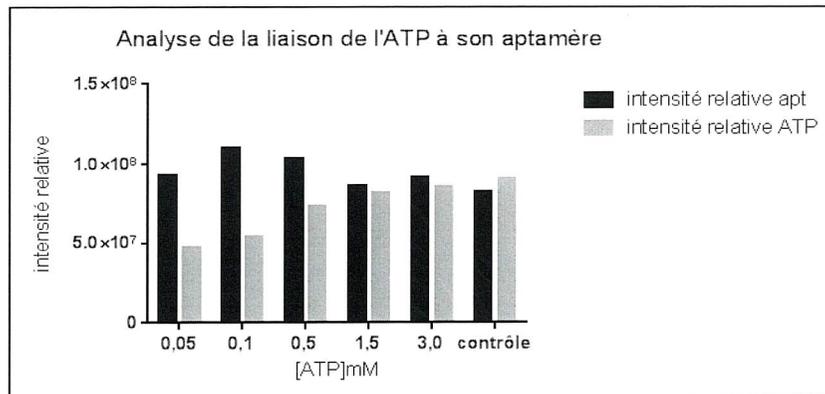


Figure 4.14 : Saturation de l'aptamère ATP par des concentrations croissantes de son ligand.

- Essai de compétition par dialyse à l'équilibre :

L'utilisation d'oligonucléotides pour établir un protocole de compétition avec l'ATP n'a pas été fructueuse. La composition des solutions dans les chambres de dialyse est décrite dans le tableau 4.4.

Tableau 4.4 : Composition des solutions dans les chambres de dialyse pour les essais de compétition

Chambre A: Aptamère	
	Concentration finale
Aptamère	10µM
MgCl ₂	200mM
H ₂ O	Jusqu'à 50µL
Chambre B: Oligonucléotide	
Oligo froid	10µM
Oligo (³² P)	1000cpm
MgCl ₂	200mM
H ₂ O	Jusqu'à 50µL

En effet, aucune migration notable n'a été observée des oligonucléotides de la chambre A à la chambre B de l'aptamère. Le résultat de la dialyse à l'équilibre utilisant ces oligonucléotides est décrit dans la figure 4.15. Tous les contrôles négatifs correspondent à un essai de dialyse avec l'oligonucléotide marqué dans la chambre B contre la solution MgCl₂ seul dans la chambre A, sans aptamère en d'autres mots. Comme les membranes des chambres à dialyse utilisée ne permettaient pas le passage des oligonucléotides, la répartition de ces courts oligonucléotides n'était évidemment pas affectée par la présence du ligand ATP.

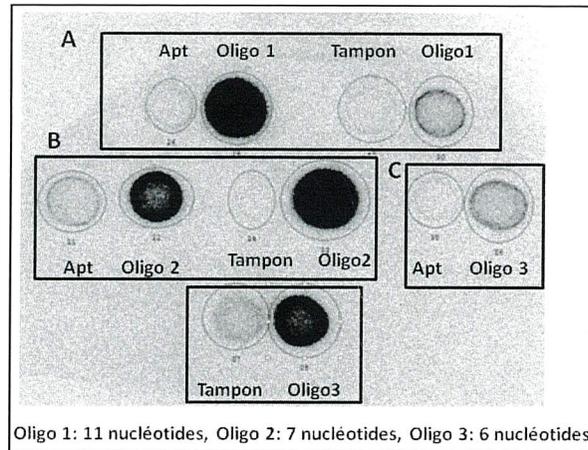


Figure 4.15 : Dialyse à l'équilibre utilisant des oligonucléotides complémentaires au site de liaison de l'ATP sur l'aptamère. (A) : Dialyse avec l'oligonucléotide 1 (11 nucléotides) et son contrôle négatif sans aptamère, (B) : dialyse avec l'oligonucléotide 2 (7 nucléotides) et contrôle négatif correspondant, (C) dialyse avec l'oligonucléotide 3 (6 nucléotides) et contrôle négatif correspondant.

4.2.4 : Analyse de la structure par méthylation à site spécifique par le DiMéthylSulfate (DMS) :

Différents essais d'optimisation ont été effectués afin de définir la sensibilité du protocole aux changements structuraux de l'aptamère ATP en présence ou absence de son ligand ou d'un oligonucléotide compétiteur. La méthylation des guanines en position N7 est théoriquement affectée par leur exposition. Cette dernière est liée à la structure de l'aptamère qui est affectée par la présence ou l'absence du ligand. Les résultats présentés ci-dessous concernent trois paramètres d'optimisation :

- Optimisation du temps de méthylation :

La méthylation a été testée pour différents temps incluant : 30 secondes, 2 et 8 minutes. L'utilisation de différentes combinaisons du DMS, AF et Pip a aussi été testée pour élucider l'action de chaque réactif sur le profil de dégradation de l'aptamère ATP. La figure 4.16 présente le résultat du gel d'analyse du temps optimal de méthylation et de l'activité du DMS, AF et Pip.

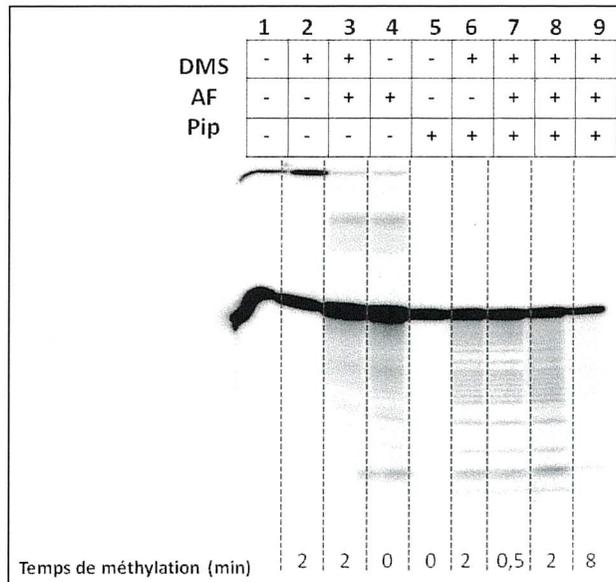


Figure 4.16 : Profil de méthylation de l'aptamère ATP pour différents temps et différentes combinaisons de produits de DMS, AF et Pip. (Puits 1 à 6) : variation de la combinaison de produits chimiques pour définir l'activité de chaque composé, (Puits 7 à 9) : Variation du temps de méthylation.

La méthylation par le DMS seul ne produit pas de clivage de l'aptamère ATP (puit 2) en comparaison avec le profil de l'aptamère non-traité (puit 1). De même, la Pip seule ne produit pas de clivage en absence de modification chimique par méthylation (puits 5). L'AF en complément ou non d'une méthylation produit un profil de dégradation dû à la dépurination de l'ADN (puits 3 et 4). Pour le temps de méthylation, la variation de celui-ci ne semble pas avoir d'impact sur le profil de dégradation de l'aptamère ATP. La variation du temps de méthylation a été suivie d'un traitement par dépurination à l'AF de l'aptamère suivi d'un clivage à la Pip.

- Optimisation des tampons de méthylation et de la concentration de DMS:

La réaction de méthylation par le DMS a par la suite été testée avec l'aptamère ATP en présence d'un oligonucléotide compétiteur de 16 nucléotides dont la séquence est la suivante :

5' CAATACTCCCCCAGGT 3'

Cet oligonucléotide est complémentaire à la pochette de liaison de l'ATP et sa liaison engendre la présence d'une région double brin. Cette région serait méthylée de

manière différentielle par rapport au reste de l'aptamère resté simple brin. Ce complexe est utilisé pour analyser l'impact de différents tampons de méthylation et différentes concentrations de DMS sur les profils de dégradation. La figure 4.17 présente le profil de dégradation de l'aptamère ATP en présence et absence de l'oligonucléotide compétiteur dans différentes conditions de méthylation. Le traitement complet correspond à une méthylation par DMS, suivie d'une dépurination par AF et d'un clivage à la Pip.

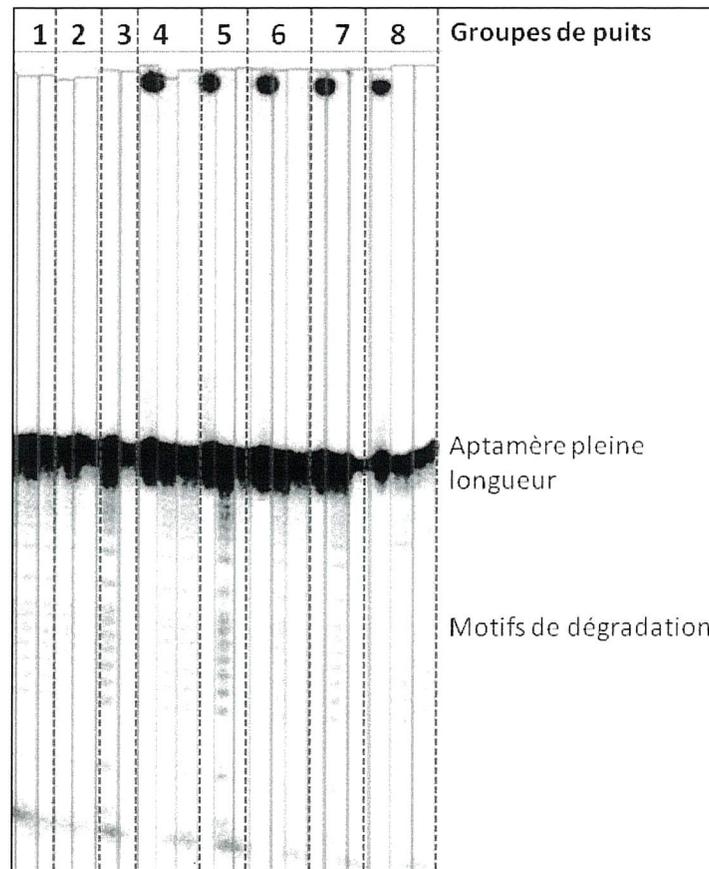


Figure 4.17 : Profils de dégradation de l'aptamère ATP en présence ou absence d'un oligonucléotide compétiteur. Différents tampons de méthylation (NaCl, KCl, NiCl) et différentes concentrations de DMS (0,1%, 0,3%, 1%, 2%, 3%) sont testés. Chaque groupe de puits de 1 à 3 représente deux puits adjacents. Le premier est le traitement complet de l'aptamère ATP seul, le second puits est le traitement complet de l'aptamère ATP en présence de l'oligonucléotide compétiteur décrit plus haut. Les groupes de puits de 4 à 8 représentent 3 puits adjacents. Le premier est la méthylation par DMS uniquement de l'aptamère seul, le second est le traitement complet de l'aptamère seul et le troisième est le traitement complet de l'aptamère en présence de l'oligonucléotide complet.

Le tableau 4.5 décrit la disposition des différents échantillons dans le gel ainsi que les paramètres modifiés.

Tableau 4.5 : Description des échantillons utilisés pour l'optimisation du tampon de méthylation et de la concentration de DMS.

Groupe de puits	Échantillons	Paramètres optimisés
1	Aptamère (TC)	Tampon NaCl
	Aptamère+Oligo (TC)	
2	Aptamère (TC)	Tampon KCl
	Aptamère+Oligo (TC)	
3	Aptamère (TC)	Tampon NiCl
	Aptamère+Oligo (TC)	
4	Aptamère (DMS)	DMS 0,1%
	Aptamère (TC)	
	Aptamère+Oligo (TC)	
5	Aptamère (DMS)	DMS 0,3%
	Aptamère (TC)	
	Aptamère+Oligo (TC)	
6	Aptamère (DMS)	DMS 1%
	Aptamère (TC)	
	Aptamère+Oligo (TC)	
7	Aptamère (DMS)	DMS 2%
	Aptamère (TC)	
	Aptamère+Oligo (TC)	
8	Aptamère (DMS)	DMS 3%
	Aptamère (TC)	
	Aptamère+Oligo (TC)	

Les profils de dégradation ne présentent pas de différences significatives selon la présence ou l'absence de l'oligonucléotide compétiteur. Les différences d'intensité sont associées à la différences de quantité de radioactivité présente dans chaque puits. D'autre part, aucune différence significative n'a été décelée selon l'utilisation

des solutions de méthylation (NaCl, KCl et NiCl). De la même manière, les différentes concentrations de DMS ne semblent pas avoir d'effet notable sur les profils de dégradation en présence ou absence de l'oligonucléotide compétiteur.

Un dernier test a été effectué pour sonder le changement des profils de dégradation en présence du ligand ATP. Pour ce faire, l'aptamère radiomarqué a été mis en présence d'une concentration saturante d'ATP. Le complexe est méthylé, dépuriné puis clivé aux sites spécifiques de méthylation. La figure 4.18 présente les profils de dégradation obtenus de l'aptamère en présence ou absence d'ATP. Le tableau 4.6 décrit les différents échantillons et traitements utilisés.

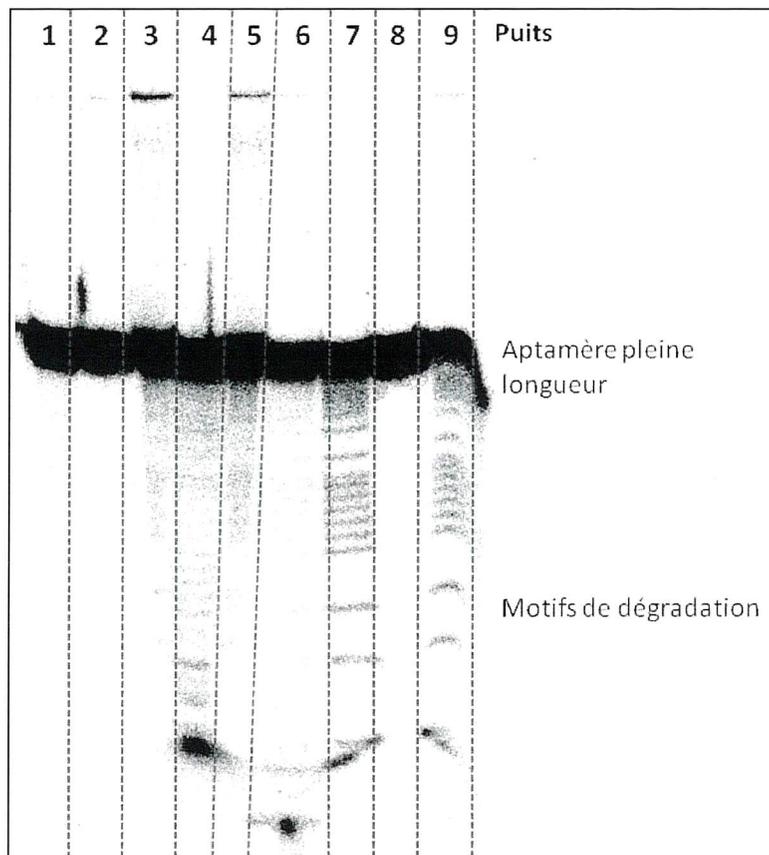


Figure 4.18 : Profils de dégradation différentielle de l'aptamère ATP en présence et absence de son ligand.

Tableau 4.6 : Description des échantillons utilisés pour l'analyse des profils de dégradation de l'aptamère ATP en présence ou absence de son ligand.

Puits	Échantillons	Traitement
1	Aptamère	Non traité
2	Aptamère	DMS
3	Aptamère	AF
4	Aptamère	Pip
5	Aptamère	DMS+AF
6	Aptamère	DMS+Pip
7	Aptamère	DMS+AF+Pip
8	Aptamère+ATP	Non traité
9	Aptamère+ATP	DMS+AF+Pip

Aucune différence au niveau du nombre ou intensité des bandes de dégradation n'est décelée en présence ou absence du ligand. Ce résultat concerne particulièrement les puits 7 et 9 (aptamère ± ATP). Concernant les contrôles négatifs (puits 1 à 7), les profils de dégradations lors de l'utilisation des différents produits seuls ou en combinaison sont en accord avec les résultats de la figure 4.16. Néanmoins, lorsque l'aptamère est mis en présence de Pip seule, une dégradation apparaît. Ceci ne correspond pas aux résultats précédents.

5. DISCUSSION:

5.1. Développement d'un biosenseur pour la détection de virus d'intérêt :

Dans cette partie, l'objectif principal était de mettre en place un protocole modèle pour la détection d'acides nucléiques sur une surface de verre à l'aide de sondes radiomarquées et/ou couplées à des AuNP. Même si dans notre protocole, nous avons utilisé la silanisation par le TESPSA pour générer des groupements COOH et attacher les séquences de captures des acides nucléiques d'intérêt, d'autres molécules et approches de modification chimique des surfaces de verre sont disponibles. L'équipe de Remacle J., (Zammatteo *et al.*, 2000) a publié une étude

comparative de différentes techniques de fonctionnalisation de surface de verre. Ces modifications comportent, entre autres, des stratégies de modification de la surface par des fonctions amines. Dans ce cas l'ADN ajouté est modifié en 5' par une fonction COOH ou un phosphate. Une autre stratégie utilise des surfaces modifiées par des COOH ou des fonctions aldéhydes (R-CHO). Dans ce cas, les ADN couplés portent une fonction amine en 5'. La figure 5.1 présente la schématisation de réactions chimiques possibles pour le couplage covalent de l'ADN sur une surface en silice.

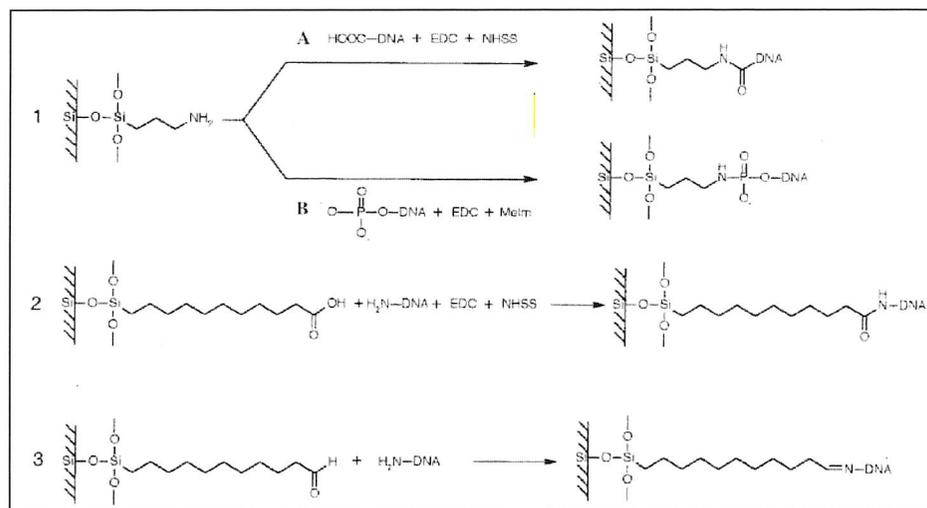


Figure 5.1 : Schéma des réactions de couplage possibles d'ADN sur une surface de verre. (1-a) couplage d'ADN carboxylé sur une surface aminée par les agents de couplage EDC et NHSS, (1-b) couplage d'un ADN phosphorylé sur une surface en silice aminée par EDC et Melm, (2) couplage d'un ADN aminé sur une surface de verre carboxylée par EDC et NHSS, (3) couplage d'un ADN aminé sur une surface de verre modifié par un aldéhyde (Zammatteo *et al.*, 2000).
 Abréviations : EDC (1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide), NHSS (N-hydroxysulfosuccinimide), Melm (1-methylimidazole)

Nous avons choisi de travailler avec la technique décrite par Gang et ses collaborateurs (Gang *et al.*, 2015) qui propose un protocole en une seule étape de silanisation avec le TESPSA pour générer des groupements COOH à la surface du verre. Nous avons choisi de travailler avec le protocole cité plus haut puisqu'il permet de fonctionnaliser une surface de silice directement après les dépôts des fonctions silanes. La génération de groupements COOH se fait de manière passive lors de l'ajout des ADN modifiés avec des groupements NH₂. L'attrait principal du protocole de Gang est l'important gain de temps par rapport aux autres protocoles, ainsi que l'utilisation d'un seul réactif chimique (TESPA) pour la silanisation (Tableau 3.1). Ce

protocole a permis le couplage covalent de différentes séquences de captures spécifiquement conçues pour l'hybridation sur les génomes de SEBOV et VIH-1. Ces séquences ont été choisies dans des régions très riches en GC pour garantir une hybridation forte et stable. D'autre part, des espaceurs ont été ajoutés aux séquences de capture pour garantir la liberté des mouvements moléculaires. Ces espaceurs ont aussi été ajoutés sur les séquences couplées sur les AuNP dans la même perspective. Les travaux de Oh (Oh *et al.*, 2011) décrivent l'optimisation de la taille des espaceurs pour le couplage d'acides nucléiques sur des AuNP. Dans ces travaux, les espaceurs de 10 adénines ont démontré le plus d'efficacité pour l'hybridation de séquences complémentaires couplées sur des AuNP. D'autres paramètres déterminent la stabilité de la liaison établie entre les sondes de détection et l'acide nucléique d'intérêt et qui sont intrinsèques aux AuNP. Ces mêmes travaux définissent les conditions optimales pour l'obtention d'un signal d'hybridation entre deux séquences complémentaires couplées à des AuNP dont la concentration de sel (NaCl). En effet, le sel dans lequel sont suspendues les AuNP est une condition limitante pour l'agrégation des nanoparticules et leur stabilité en solution.

Le modèle de détection mis en place dans nos travaux est assimilable aux puces à ADN. En effet les deux protocoles (détection sur lame de verre et puces à ADN) reposent sur les mêmes paramètres critiques de détection. A titre d'exemple, l'utilisation d'une séquence de capture simple brin munie d'un espaceur influence l'efficacité de l'évènement d'hybridation. Aussi, la structure secondaire de la séquence à détecter (dans notre cas, l'ARN viral) est critique pour l'encombrement stérique au niveau de la lame ainsi que l'exposition des sites d'hybridation (Peytavi *et al.*, 2005). Plusieurs autres paramètres ont été évalués et optimisés pour assurer un signal de détection interprétable. Par exemple, la concentration de l'ADN utilisée lors de la fonctionnalisation de la lame de verre a été testé (100 et 50 μ M). La quantité d'ADN déposée sur les spots (7 μ L) varie selon la concentration de la solution initiale. Lorsqu'une concentration de 100 μ M est utilisée, le signal obtenu n'est pas répétable. Ceci pourrait être dû à l'encombrement stérique causé par un trop grand rapprochement entre les séquences de capture empêchant ainsi l'hybridation. Au contraire, avec une concentration réduite de moitié (50 μ M), le signal est répétable et le signal d'hybridation est nettement visible et quantifiable. D'autres essais avec

différentes concentrations d'ADN seront faits pour déterminer la quantité optimale limite d'ADN à déposer sur la lame pour une meilleure capacité à lier les sondes.

Les résultats du modèle de détection évalué dans ce travail montrent qu'il est possible de traduire des événements d'hybridation par un signal radioactif. En effet, il a été possible d'hybrider des sondes radioactives (couplées à des AuNP) sur des séquences déjà attachées sur des lames de verre, ce qui permettra de tester plusieurs variantes pour optimiser le système en laboratoire. Cette plateforme est une première étape pour le développement d'un biosenseur à fibre optique où le rôle des AuNP sera d'amplifier le signal et ainsi garantir une plus grande sensibilité de la fibre.

Les AuNP ont déjà été utilisées pour augmenter les performances des fibres optiques en détection de molécules d'intérêt. Par exemple, (Lepinay *et al.*, 2014) ont utilisé des nanocages d'or (AuNC) pour couvrir la surface silanisée. Les fibres optiques fonctionnalisées avec les AuNC étaient par la suite activées et immergées dans des solutions d'avidine pour permettre leur fixation. Ainsi, le dispositif était capable de détecter la présence de biotines (ligand de l'avidine) dans des solutions aqueuses. Dans une autre variante, les propriétés d'agrégation des AuNP ont été exploitées par (Cordray *et al.*, 2012). Deux pools de AuNP fonctionnalisées avec des séquences oligonucléotidiques complémentaires ont été mises en contact. L'hybridation des séquences a résulté en l'agrégation des AuNP. La couleur des solutions a viré du jaune au rouge. Ce résultat a par la suite été confirmé par une analyse de la diffusion de la lumière émise par un épandeur de lumière à fibre optique sur une surface en silice. Le shift spectral a été défini comme proportionnel à la quantité d'ADN complémentaire présent dans la réaction finale et présenté dans la figure 5.2.

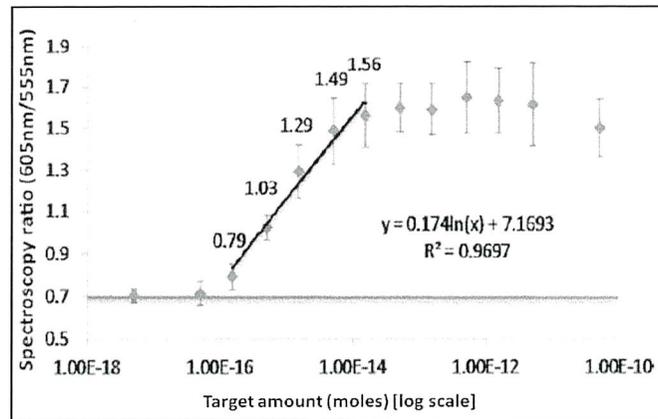


Figure 5.2 : Moyenne des pics de la diffusion spectrale d'une lumière verte à travers des spots d'agrégats de AuNP fonctionnalisées avec des ADN complémentaires. La moyenne est calculée à partir du pic de la lumière diffusée à 605nm et 555nm. Le ratio est proportionnel à la quantité d'ADN complémentaire ajouté (Adapté de (Cordray *et al.*, 2012)).

5.2. Mise en place de protocoles pour évaluer l'interaction entre des aptamères d'ADN et leurs ligands :

5.2.1 : Analyse de la liaison par Shifted Reverse-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SR-PAGE) :

Le SR-PAGE est un protocole innovant qui se voudrait complémentaire du SELEX pour la découverte de nouveaux aptamères. Dans les travaux de Jonathan Ouellet (stagiaire postdoctoral, laboratoire Jonathan Perreault, 2012), des bibliothèques SELEX de mutants de l'aptamère de la TPP ont été utilisées pour le développement de la technique. Ces mutants visaient à modifier l'affinité de l'aptamère du TPP pour le rendre plus spécifique à la thiamine (Thi). L'aptamère TPP reconnaît son ligand au niveau de la thiamine et des phosphates. La reconnaissance du domaine phosphate est Mg^{2+} dépendante. Les analogues du TPP (thiamine monophosphate (TMP) et la Thi) possèdent des domaines phosphates différents (TMP) ou inexistantes (Thi), ils se lient donc plus faiblement à l'aptamère. La K_D de la TPP est de 600nM contre 3 μ M pour la TMP et 50 μ M pour la Thi (Noeske *et al.*, 2006). Les travaux de SR-PAGE ont donc visé la pochette de liaison pour le domaine de liaison du pyrophosphate de l'aptamère. Ceci engendrerait donc un déplacement de l'affinité de la TPP pour la Thi.

Suite à la saturation du gel lors de la première génération du SELEX (décrit en 3.3.1), des concentrations décroissantes de Thi ont été utilisées d'un gel à l'autre.

Ainsi, les aptamères sélectionnés possédaient des affinités plus importantes pour la Thi. A chaque 2^{ème} migration, les bandes ayant dépassé le niveau des puits sont excisées, éluées, amplifiées par PCR et transcrites en ARN avant d'être resoumises à au protocole SR-PAGE (figure 4.9).

Dans ce cadre, le SR-PAGE peut être utilisé comme complémentaire au SELEX. Il présente l'avantage d'utiliser des ligands non immobilisés pour la sélection et donc peut présenter une alternative à la chromatographie d'affinité souvent utilisée pour l'étape de sélection dans les protocoles de SELEX. Les ligands n'étant pas couplés à des billes ou des colonnes comme dans cette dernière, il n'y a pas de phénomène d'encombrement stérique et tous les groupements potentiellement impliqués dans la liaison à l'aptamère sont exploités. Néanmoins, il n'y a pas d'avantage de temps puisque un protocole SR-PAGE nécessite au minimum 48 heures pour obtenir les bandes d'intérêt.

Nous avons essayé, dans les travaux présentés précédemment, d'exploiter les avantages du SR-PAGE pour investiguer les changements structuraux induits par la liaison d'un aptamère à son ligand spécifique. Pour ce faire, l'aptamère ATP a été mis en contact avec son ligand à une concentration saturante et un dépassement de la ligne des puits a été observé comme attendu. Ceci a confirmé la fiabilité de la technique pour sonder le repliement des aptamères mais une limite de faisabilité reste à contrer. En effet, un protocole SR-PAGE ne présente pas la possibilité d'utiliser un contrôle négatif pour un aptamère analysé dans un seul gel (sauf lorsque la structure de l'aptamère est bien connue et la génération de mutants ayant la même structure est possible). Pour ce faire, il a fallu utiliser un second gel, migré dans les mêmes conditions et pendant le même temps mais sur lequel un autre ligand est vaporisé pour obtenir une conformation non liée de l'aptamère (structure native). Ce recours peut être handicapant pour l'utilisateur de notre protocole puisqu'il nécessite un double dispositif en plus du temps d'attente relativement long avant l'obtention du résultat. Néanmoins, le SR-PAGE reste une alternative innovante pour détecter des événements de liaison d'ADN à de petites molécules en se basant sur la structure. Cette approche n'est pas offerte par des techniques de retard sur gel comme le EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) qui donne des informations sur la spécificité de liaison d'une protéine à une séquence d'ADN par exemple. Dans un autre contexte, le SR-PAGE peut être avantageux dans la

découverte de séquences ayant la capacité de créer des phénomènes de « switch » suite à leur liaison à un ligand spécifique. La démarche standard pour l'analyse des aptamères commence par une sélection par SELEX puis les aptamères candidats sont soumis à différents tests pour évaluer leur capacité à changer de conformation en présence de leur ligand. Par exemple, Nutiu et Li (Nutiu *et al.*, 2003) ont utilisé des aptamères déjà caractérisés couplés à des fluorophores et des *quencher*s pour évaluer leur capacité de liaison. La conformation adoptée par l'aptamère en présence de son ligand éloigne le fluorophore du *quencher* et génère un signal fluorescent. Le SR-PAGE permet l'obtention d'un tel résultat sans besoin de caractérisation préalable de l'aptamère. En effet, comme discuté précédemment, les aptamères sont spécifiquement sélectionnés pour leur capacité de switcher.

5.2.2. Analyse de la liaison par fluorométrie :

Plusieurs approches sont rapportées dans la littérature concernant l'analyse ou quantification de liaisons d'ADN à des molécules d'intérêt par fluorométrie. Nous nous sommes inspirés du travail de Sarpong et Datta (Sarpong *et al.*, 2012) qui ont évalué l'utilisation de différents chromophores (YOYO, bromure d'éthidium (EtBr), thiazole orange (TO), SYBR Green I (SGI) et Hoechst 33258) pour analyser la liaison de différents aptamères (dont l'aptamère de l'ATP) à leurs ligands respectifs. Selon la présence ou l'absence du ligand, le chromophore s'intercale de manière différente dans l'aptamère. Se basant sur cette propriété, le signal de fluorescence détecté dans l'aptamère. Se basant sur cette propriété, le signal de fluorescence détecté peut traduire l'état de liaison des aptamères. La figure 5.3 montre la décroissance de la fluorescence entre l'état lié et non lié de l'aptamère ATP calculée pour l'intercalation des cinq chromophores cités plus-haut.

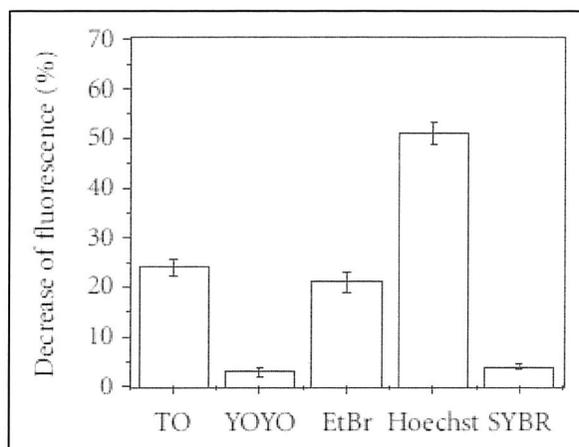


Figure 5.3 : Décroissance de la fluorescence entre l'état lié et non lié de l'aptamère ATP en présence de chromophores.

Nous nous sommes par la suite intéressés au chromophore SGI pour évaluer sa sensibilité reportée comme minime en présence de l'aptamère ATP. Le phénomène d'intercalation du SGI dans un aptamère selon sa disponibilité a été exploité pour le développement de biosenseurs. Par exemple, l'équipe de Chu (J. Li *et al.*, 2015) ont mis en place un modèle de détection de l'ATP par fluorométrie. Ce modèle de détection se base sur la conformation G-quadruplex de l'aptamère ATP qui est dépendante de la présence du ligand. Pour ce faire, l'aptamère est hybridé dans un premier temps avec un brin complémentaire. Le SGI s'intercale intensément en présence d'ADNdb et émet un signal fluorescent. En présence de l'ATP, une compétition avec le brin complémentaire s'impose et l'aptamère se lie préférentiellement à l'ATP. L'enzyme Exonucléase III (ExoIII) présente dans la réaction va alors dégrader le brin complémentaire simple brin et la fluorescence décroît en conséquence. Le modèle de détection des changements conformationnels de l'aptamère ATP sont présentés dans la figure 5.4.

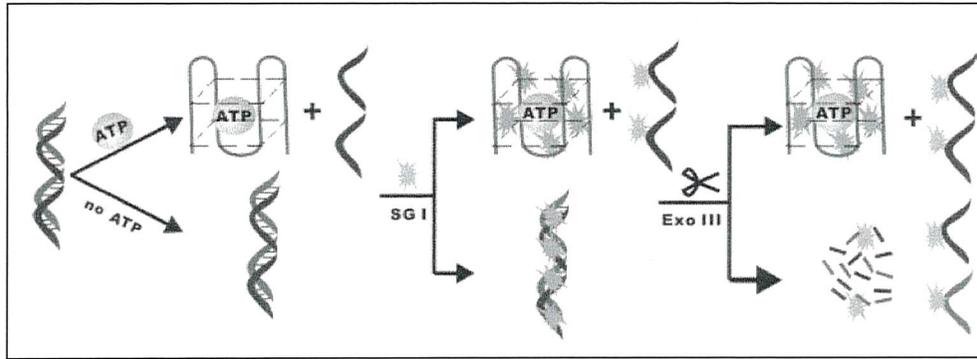


Figure 5.4 : Schématisation du modèle de détection des G-quadruplex par signal fluorescent différentiel de l'intercalation du SGI. En présence d'ATP, l'aptamère se déshybride du brin complémentaire par compétition et se lie à l'ATP. L'exoIII dégrade le brin simple. En absence d'ATP, l'aptamère s'hybride au brin complémentaire et la fluorescence est plus importante qu'en présence d'ATP. Ceci est dû à la préférence du SGI à l'ADNdb. (Adapté de (J. Li *et al.*, 2015).

Dans une autre variante, les propriétés d'intercalation du SYBR Green ont été exploitées pour sonder les changements des T_m° des aptamères selon leur état lié ou non lié. Pour ce faire, l'équipe de Easley (Hu *et al.*, 2015) a utilisé le facteur de croissance dérivé des plaquette (PDGF) et son aptamère ADN spécifique. Lorsque PDGF se lie à son aptamère, un complexe de grande stabilité se forme. En utilisant une machine de PCR quantitative avec un programme d'analyse de T_m° , il a été possible de conclure que la T_m du complexe (63°C) est supérieure à celle de l'aptamère seul (57°C). L'intercalation du SYBR Green dans la protéine seule est négligeable. La figure 5.5 résume le résultat des analyses de liaison de l'aptamère à PDGF par températures de fusion.

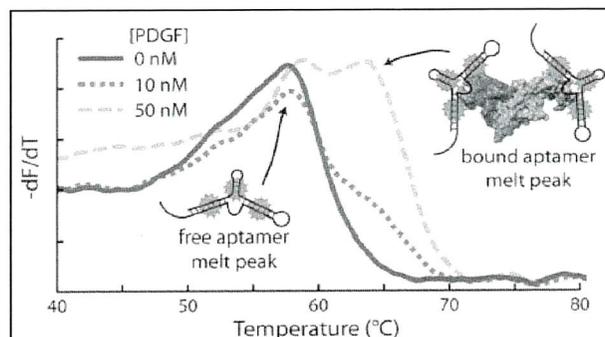


Figure 5.5 : Analyse thermofluorométrique de la liaison de l'aptamère à PDGF en utilisant le SYBR Green comme agent intercalant. Le pic correspondant à la T_m° de l'aptamère seul est inférieur à celui du complexe aptamère-PDGF. Ceci traduit la nécessité d'une énergie supérieure pour dénaturer le complexe plus stable que l'aptamère seul (Adapté de (Hu *et al.*, 2015).

Nous avons utilisé une approche similaire pour nos trois aptamères, mais sans succès. Nous avons donc tenté une approche où la simple fluorométrie (à température constante) a été utilisée. Notre protocole de quantification de la liaison d'un aptamère à son ligand permet aussi d'évaluer la K_D . En faisant varier la concentration de ligand, nous avons pu générer une courbe sigmoïdale pour l'aptamère de la L-Arg représentative de la saturation de toute la population d'aptamères. La K_D calculée est proche de celle décrite dans la littérature (figure 4.12). Néanmoins, aucun résultat concluant n'a pu être obtenu pour l'aptamère de l'éthanolamine ni celui de l'ATP. Ceci est probablement dû au fait que les K_D de ces aptamères est de l'ordre du micro et nanomolaire (10nM). Pour pouvoir couvrir une K_D comme celle de l'aptamère de l'éthanolamine, la concentration optimale de l'aptamère serait de 1nM ou moins. Avec une concentration pareille, les plateaux de saturation auraient pu être théoriquement atteints. Malheureusement, suite à des essais de limites de détection, la sensibilité du fluorimètre n'atteint pas une aussi faible concentration d'ADN. D'autre part, il est important de noter que les marges d'erreurs relatives aux K_D calculées sont très grandes. Les résultats présentés dans ce travail sont donc sujettes à critiques et nécessitent des analyses thermodynamiques plus approfondies.

5.2.3. Analyse de la liaison par dialyse à l'équilibre :

La dialyse à l'équilibre est une technique d'évaluation de l'affinité de molécules biologiques pour d'autres molécules se basant sur un phénomène de diffusion à travers une membrane. Cette technique a été utilisée pour élucider l'affinité de *riboswitchs* tels que celui de la glycine. Dans les travaux de Ruff (Ruff *et al.*, 2014), l'affinité du *riboswitch* a été évaluée en utilisant de la glycine modifiée par du ^{14}C . La quantification de la migration de la glycine à travers la membrane des chambres de dialyse a permis d'obtenir une K_D de 2 μM . Nous nous sommes basé sur ce protocole standard pour évaluer l'affinité de l'aptamère ATP à son ligand. Suite à une analyse avec le logiciel GraphPad Prism 6, avec une courbe de liaison standard (Coefficient de Hill 2), la K_D estimée était de 200 μM contre 10 μM décrits dans la littérature. Un premier essai d'adaptation au modèle de liaison standard avec un coefficient de Hill = 1 n'a pas donné de calcul de K_D interprétable (de l'ordre du mM). L'utilisation d'un coefficient de Hill = 2 a donné la K_D la plus relativement proche de celle décrite dans la littérature. Ce choix repose sur le fait que la pochette de liaison de l'aptamère

utilisé peut lier deux molécules d'AMP (Adénine Monophosphate) avec une même affinité que celle de l'ATP (Lin *et al.*, 1997).

L'utilisation de la dialyse à l'équilibre dans notre contexte visait l'établissement d'un protocole de compétition pour le site de liaison de l'ATP. Des oligonucléotides complémentaires à la pochette de liaison ont été utilisés pour évaluer la faisabilité de la technique (Figure 4.15). Malheureusement, aucune migration des oligonucléotides complémentaires n'a été détectée à travers la membrane de diffusion même dans les contrôles négatifs (tampon *versus* oligonucléotide). La membrane des chambres à dialyse étant faite de cellulose régénérée, un phénomène de répulsion serait peu probable pour expliquer la non migration des oligonucléotides. Pareillement, leurs poids moléculaires est inférieur au seuil de diffusion de la membrane indiqué par la manufacturier (tableau 3.12). Néanmoins, la faisabilité du protocole utilisant des acides nucléiques de part et d'autre de la membrane des chambres à dialyse est à revoir puisque les résultats obtenus ne correspondent pas à ceux escomptés au vue des caractéristiques publiées par le fabricant. Comme ces membranes sont utilisées typiquement pour la dialyse des protéines, qui sont plus globulaires que les acides nucléiques, la corrélation entre le poids moléculaire et la taille des pores est probablement à interpréter différemment. Cette approche aurait eu comme avantage supplémentaire de permettre de sélectionner efficacement des oligonucléotides complémentaires pour développer un système-signal basée sur l'appariement (ou non) d'un ADN-modifié à l'aptamère, dépendamment de la présence du ligand. La modification en question ouvrirait la porte à toutes sortes de signaux : fluorophores, nanoparticules, donneurs d'électron, etc. De plus, l'approche aurait été applicable à n'importe quel aptamère avec des équipements standards pour un laboratoire de biologie moléculaire.

5.2.4 : Analyse de la structure par méthylation à site spécifique par le DiméthylSulfate (DMS) :

Le probing structural des aptamères est possible grâce à une multitude de réactifs chimiques tels que le DMS. Plusieurs travaux ont démontré l'utilisation du DMS pour la caractérisation de *riboswitchs* (Hanson *et al.*, 2005) et des aptamères tels que l'aptamère de la cellulose (Boese *et al.*, 2007). Dans notre cas, nous avons choisi d'analyser par DMS l'aptamère de l'ATP qui possède une structure en G-quadruplex. L'utilisation du DMS pour sonder les modifications structurales sur de telles

structures est un protocole précédemment décrit dans les travaux de Sun D. et ses collaborateurs (Sun *et al.*, 2010). Les G-quadruplex sont des structures d'ADN complexes qui ne se limitent pas aux aptamères synthétiques. Par exemple, plusieurs G-quadruplex sont trouvés dans le génome humain (Huppert *et al.*, 2007). Dans notre contexte, l'intérêt de développer un protocole basé sur la méthylation des aptamères est de mettre en place un moyen facile et répétable d'élucider les modifications qu'induit la liaison de celui-ci à son ligand. Pour les étapes de clivage chimique de l'ADN, le protocole élaboré dans ce travail s'inspire des protocoles de séquençage d'ADN. En 1977, Maxam et Gilbert décrivaient un protocole utilisant la méthylation des guanines par DMS, la dépurination par AF des adénines et des guanines et l'hydrolyse des purines par l'hydrazine pour analyser les séquences d'ADN (Maxam *et al.*, 1977). Cette même procédure est utilisée dans nos travaux pour analyser l'exposition des guanines dans des aptamères ADN selon la présence ou l'absence du ligand ATP. Bien que nous ayons obtenu des bandes correspondant aux guanines, les essais n'ont néanmoins donné aucun résultat convaincant puisque aucune différence significative n'a été décelée dans les profils de dégradation site spécifique des aptamères. En effet, les profils de dégradation différentiels (en présence/absence de l'ATP ou de l'oligonucléotide compétiteur) démontrent le même nombre de bandes, d'intensité similaire, en dessous de la bande de longueur totale de l'aptamère (Figures 4.16 et 4.17). Ces bandes sont dans tous les cas au nombre de 16 et correspondent aux 16 guanines présentes dans la séquence de l'aptamère ATP (Chap.1.3.2). Ce résultat suggère que la liaison de l'aptamère ATP à son ligand ou à l'oligonucléotide complémentaire ne modifie pas sensiblement l'exposition des guanines à la méthylation et donc ne produit pas de changements au niveau des profils de dégradation. Une autre hypothèse suggère que les conditions expérimentales ont probablement généré des méthylations uniformes indépendantes du repliement de l'aptamère. Au-delà des aptamères G-quadruplex, le protocole décrit précédemment pourrait être utile pour sonder les modifications structurales sur des séquences ADN à la seule condition que l'exposition des guanines soit différentes entre deux conditions analysées.

Plusieurs autres protocoles de modifications chimiques ont été testés en parallèle avec les protocoles présentés dans ce mémoire. Par exemple, le *probing* enzymatique de l'aptamère en présence et absence de l'ATP a été effectué en

utilisant l'enzyme T7 Endonucléase I (Sadowski, 1971). Cette enzyme possède une activité de clivage spécifique à l'ADNsb par rapport au double brin. Théoriquement, l'aptamère ATP possède une conformation simple brin en absence de son ligand. Lorsque l'ATP est ajoutée, le repliement en G-quadruplex est favorisée, de même qu'une courte tige et boucle double brin. L'activité de l'enzyme T7 Endonucléase I devrait donc être différente selon la présence ou l'absence du ligand. Pour tester ce protocole, l'aptamère a été radiomarqué et digéré par l'enzyme dans les deux conditions citées. Le résultat de dégradation n'a cependant montré aucune différence significative entre les aptamères liés et non liés. Dans la même optique, un probing chimique par l'hypochlorite de sodium a été effectué et n'a généré aucun résultat concluant. Les résultats négatifs obtenus pourraient être expliqués par le fait que l'aptamère de l'ATP se replie spontanément en G-quadruplex. Cette structure est stabilisée par les cations K^+ et Na^+ présents dans le tampon de sélection (tableau 3.11) (Lane *et al.*, 2008). Afin de contrer ce repliement, un chauffage à $95^\circ C$ pendant 5 minutes a pourtant été effectué afin de linéariser l'aptamère, sans effet notable.

6.CONCLUSION ET PERSPECTIVES:

Les travaux présentés ont visé à implanter des protocoles innovateurs en vue de faciliter :

- La détection d'acides nucléiques grâce à un modèle de fonctionnalisation de surface en silice
- Implanter des protocoles d'analyse structurale et d'analyse de la liaison des aptamères à leurs ligands.

Pour le premier volet, il a été possible de détecter des événements d'hybridation d'acides nucléiques sur des lames de microscope représentatives de fibres optiques. Malheureusement, dû aux problèmes de transcription, les essais en utilisant des fragments d'ARN viral synthétisés *in vitro* n'ont pu être conduits. Néanmoins il a été possible d'effectuer des hybridations en sandwich en utilisant des sondes signal couplées à des AuNP.

En suivi de ce protocole, des essais de fonctionnalisation et d'hybridation sur des fibres optiques sont en développement en collaboration avec le laboratoire du Pr

Wojteck J. Bock (Université du Québec en Outaouais, QC, Canada). A moyen terme, des essais avec des acides nucléiques de phages sont envisagés pour tester la généralisation du biosenseur modèle. Des essais sur des échantillons cliniques de patients infectés par VIH-1 sont envisagés à long terme si nous démontrons une excellente performance pour la plateforme biosenseur.

Pour le second volet de ces travaux, des résultats prometteurs ont été obtenus grâce à la technique SR-PAGE. Des changements structuraux dépendants de la présence du ligand spécifique de l'aptamère ont été détectés. En complément à son utilisation de sélection, cette technique est fort prometteuse comme technique analytique permettant l'évaluation de changements de conformations dans des acides nucléiques. Un bon nombre d'autres protocoles ont été testés tout au long de ces travaux (méthylation par le DMS, modification chimique par l'hypochlorite de sodium, digestion enzymatique par la T7 endonucléase I). Malheureusement aucun résultat interprétable ou répétable n'a été généré par ces protocoles. Le protocole de fluorométrie quant à lui permis des calculs de K_D proches de ceux décrits dans la littérature. Ce protocole pourrait donc être utilisé pour caractériser des aptamères dont la K_D dépasse 10nM. L'objectif de cette partie du mémoire a néanmoins été atteint puisque le protocole utilisant la fluorométrie mis en place peut être considéré comme universel.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahlquist P (2006) Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nature reviews. Microbiology* 4(5):371-382.
- Almadidy A, Watterson J, Piunno PAE, Foulds IV, Horgen PA & Krull U (2003) A fibre-optic biosensor for detection of microbial contamination. *Can. J. Chem.* 81(5):339-349.
- Boese BJ & Breaker RR (2007) In vitro selection and characterization of cellulose-binding DNA aptamers. *Nucleic Acids Res.* 35(19):6378-6388.
- Brewer AC, J.P. M & R.K. P (1990) A simplified method for in vivo footprinting using DMS. *Nucleic Acids Res.* 18(18):5574.
- Broude NE (2002) Stem-loop oligonucleotides: a robust tool for molecular biology and biotechnology. *Trends Biotechnol.* 20(6):249-256.
- Burmeister PE, Lewis SD, Silva RF, Preiss JR, Horwitz LR, Pendergrast PS, McCauley TG, Kurz JC, Epstein DM, Wilson C & Keefe AD (2005) Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF. *Chem. Biol.* 12(1):25-33.
- Cordray MS, Amdahl M & Richards-Kortum RR (2012) Gold nanoparticle aggregation for quantification of oligonucleotides: optimization and increased dynamic range. *Anal. Biochem.* 431(2):99-105.
- Corning (2014) Corning® SMF-28® Ultra Optical Fiber. *Product Information*.
- Eichman BF, Ortiz-Lombardia M, Aymami J, Coll M & Ho PS (2002) The inherent properties of DNA four-way junctions: comparing the crystal structures of holliday junctions. *J. Mol. Biol.* 320(5):1037-1051.
- Fearon M (2005) The laboratory diagnosis of HIV infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 16(1):26-30.
- Gang A, Gabernet G, Renner LD, Baraban L & Cuniberti G (2015) A simple two-step silane-based (bio-) receptor molecule immobilization without additional binding site passivation. *RSC Adv.* 5(45):35631-35634.
- Goel A, Batra P & Wati L (2015) Ebola: A Review. *Indian Journal of Microbiological Research* 2(1):64-71.
- Griffin LC, Tidmarsh GF, Bock LC, Toole JJ & Leung LLK (1993) In Vivo Anticoagulant Properties of a Novel Nucleotide-Based Thrombin Inhibitor and Demonstration of Regional Anticoagulation in Extracorporeal Circuits. *Blood* 81(12):3271-3276.
- Hallera A (2013) Folding and ligand recognition of the TPP riboswitch aptamer at single-molecule resolution. *PNAS* 110(11):4188-4193.
- Hanson S, Bauer G, Fink B & Suess B (2005) Molecular analysis of a synthetic tetracycline-binding riboswitch. *RNA* 11(4):503-511.
- Harada K & Frankel AD (1995) Identification of two novel arginine binding DNAs. *The EMBO Journal* 14(23):5798-5811.
- Henao-Restrepo AM, Longini IM, Egger M, Dean NE, Edmunds WJ, Camacho A, Carroll MW, Doumbia M, Draguez B, Duraffour S, Enwere G, Grais R, Gunther S, Hossmann S, Kondé MK, Kone S, Kuisma E, Levine MM, Mandal S, Norheim G, Riveros X, Soumah A, Trelle S, Vicari AS, Watson CH, Kéïta S, Kieny MP & Røttingen JA (2015) Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial. *The Lancet* 386(9996):857-866.
- Hong KL & Sooter LJ (2015) Single-Stranded DNA Aptamers against Pathogens and Toxins: Identification and Biosensing Applications. *BioMed research international* 2015:419318.
- Hu J, Kim J & Easley CJ (2015) Quantifying Aptamer-Protein Binding via Thermofluorimetric Analysis. *Analytical methods : advancing methods and applications* 7(17):7358-7362.
- Huppert JL & Balasubramanian S (2007) G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* 35(2):406-413.

- James SW & Tatam RP (2003) Optical fibre long-period grating sensors: characteristics and application. *Meas. Sci. Technol.* 14:49-61.
- Judy Ruckman LSG, Jim Beeson, Sheela Waugh, Wendy L. Gillette, & Dwight D. Henninger LC-W, and Nebojsa Janjic (1998) 2'-Fluoropyrimidine RNA-based Aptamers to the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 273(32):20556–20567.
- Karlsson Hedestam GB, Fouchier RA, Phogat S, Burton DR, Sodroski J & Wyatt RT (2008) The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nature reviews. Microbiology* 6(2):143-155.
- Kaushik A, Tiwari S, Dev Jayant R, Marty A & Nair M (2016) Towards detection and diagnosis of Ebola virus disease at point-of-care. *Biosens. Bioelectron.* 75:254-272.
- Keefe AD & Cload ST (2008) SELEX with modified nucleotides. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12(4):448-456.
- Keefe AD, Pai S & Ellington A (2010) Aptamers as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9(7):537-550.
- Kleijnung F, Bier FF, Warsinke A & Scheller FW (1997) Fibre-optic genosensor for specific determination of femtomolar DNA oligomers. *Anal. Chim. Acta* (350):51-58.
- Lane AN, Chaires JB, Gray RD & Trent JO (2008) Stability and kinetics of G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res.* 36(17):5482-5515.
- Lee KY, Kang H, Ryu SH, Lee DS, Lee JH & Kim S (2010) Bioimaging of nucleolin aptamer-containing 5-(N-benzylcarboxamide)-2'-deoxyuridine more capable of specific binding to targets in cancer cells. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:168306.
- Lepinay S, Staff A, Ianoul A & Albert J (2014) Improved detection limits of protein optical fiber biosensors coated with gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* 52:337-344.
- Leung A, Shankar PM & Mutharasan R (2007) A review of fiber-optic biosensors. *Sensors Actuators B: Chem.* 125(2):688-703.
- Li J, Tian X, Kong JX & Chu X (2015) A G-quadruplex-based Label-free Fluorometric Aptasensor for Adenosine Triphosphate Detection. *The Japan Society for Analytical Chemistry* 31:469-473.
- Li RNay (2003) Structure-Switching Signaling Aptamers. *J. Am. Chem. Soc.* 125:4771-4778.
- Lin CH & Patel DJ (1997) Structural basis of DNA folding and recognition in an AMP-DNA aptamer complex: distinct architectures but common recognition motifs for DNA and RNA aptamers complexed to AMP. *Chem. Biol.* 4(11):817-832.
- Liu JK (2014) The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann Med Surg (Lond)* 3(4):113-116.
- Liu WB, Li ZX, Du Y & Cao GW (2015) Ebola virus disease: from epidemiology to prophylaxis. *Military Medical Research* 2:7.
- Mann D, Reinemann C, Stoltenburg R & Strehlitz B (2005) In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338(4):1928-1934.
- Marazuela D & Moreno-Bondi MC (2002) Fiber-optic biosensors--an overview. *Anal. Bioanal. Chem.* 372(5-6):664-682.
- Maxam AM & Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(2):560-564.
- McElroy AK, Erickson BR, Flietstra TD, Rollin PE, Nichol ST, Towner JS & Spiropoulou CF (2014) Ebola hemorrhagic Fever: novel biomarker correlates of clinical outcome. *J. Infect. Dis.* 210(4):558-566.
- Muhlberger E (2007) Filovirus replication and transcription. *Future virology* 2(2):205-215.
- Muller M, Weigand JE, Weichenrieder O & Suess B (2006) Thermodynamic characterization of an engineered tetracycline-binding riboswitch. *Nucleic Acids Res.* 34(9):2607-2617.
- Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunningham ET, Jr., Guyer DR & Adamis AP (2006) Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5(2):123-132.
- Noeske J, Richter C, Stirnal E, Schwalbe H & Wohnert J (2006) Phosphate-group recognition by the aptamer domain of the thiamine pyrophosphate sensing riboswitch. *ChemBioChem* 7(9):1451-1456.

- Nutiu R & Li Y (2003) Structure-switching signaling aptamers. *J. Am. Chem. Soc.* 125(16):4771-4778.
- Oh JH & Lee JS (2011) Designed hybridization properties of DNA-gold nanoparticle conjugates for the ultrasensitive detection of a single-base mutation in the breast cancer gene BRCA1. *Anal. Chem.* 83(19):7364-7370.
- OMS (2003) Une stratégie globale du secteur de la santé contre le VIH/SIDA : 2003-2007: créer un cadre pour des partenariats et des actions concrètes. *Bibliothèque de l'OMS*.
- Peytavi R, Tang LY, Raymond FR, Boissinot K, Bissonnette L, Boissinot M, Picard FJ, Huletsky A, Ouellette M & Bergeron MG (2005) Correlation between microarray DNA hybridization efficiency and the position of short capture probe on the target nucleic acid. *BioTechniques* 39:89-96.
- Proske D, Gilch S, Winnacker EL, Wopfner F, Schätzl HM & M. F (2002) Prion-Protein-Specific Aptamer Reduces PrPSc Formation. *ChemBioChem* 3:717 - 725.
- Roossinck MJ (2011) The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nature reviews. Microbiology* 9(2):99-108.
- Ruckman J, Green LS, Beeson J, Waugh S, Gillette WL, Henninger DD, Claesson-Welsh L & Janjic N (1998) 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.* 273(32):20556-20567.
- Ruff KM & Strobel SA (2014) Ligand binding by the tandem glycine riboswitch depends on aptamer dimerization but not double ligand occupancy. *RNA* 20(11):1775-1788.
- Ruigrok VJ, Levisson M, Hekelaar J, Smidt H, Dijkstra BW & van der Oost J (2012) Characterization of aptamer-protein complexes by X-ray crystallography and alternative approaches. *International journal of molecular sciences* 13(8):10537-10552.
- Sadowski PD (1971) Bacteriophage T7 endonuclease. I. Properties of the enzyme purified from T7 phage-infected *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 246(1):209-216.
- Safdar A & Sher A (2011) Differential Gene Expression and Its Possible Therapeutic Implications. *Gene Therapy - Developments and Future Perspectives*, , Chunsheng K. (Édit.) InTech.
- Sarpong K & Datta B (2012) Nucleic-Acid-binding chromophores as efficient indicators of aptamer-target interactions. *Journal of nucleic acids* 2012:247280.
- Shangguan D, Li Y, Tang Z, Cao ZC, Chen HW, Mallikaratchy P, Sefah K, Yang CJ & Tan W (2006) Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(32):11838-11843.
- Sharp PM & Hahn BH (2011) Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 1(1):a006841.
- Skrabanja AT, Bouman EA & Dagnelie PC (2005) Potential value of adenosine 5'-triphosphate (ATP) and adenosine in anaesthesia and intensive care medicine. *British journal of anaesthesia* 94(5):556-562.
- Song KM, Lee S & Ban C (2012) Aptamers and their biological applications. *Sensors (Basel)* 12(1):612-631.
- Song S, Xu H & Fan C (2006) Potential diagnostic applications of biosensors: current and future directions. *Int J Nanomedicine* 1(4):433-440.
- Stojanovic MN, de Prada P & Landry DW (2001) Aptamer-Based Folding Fluorescent Sensor for Cocaine. *J. Am. Chem. Soc.* 123(21):4928-4931.
- Sun D & Hurley LH (2010) Biochemical techniques for the characterization of G-quadruplex structures: EMSA, DMS footprinting, and DNA polymerase stop assay. *Methods Mol Biol* 608:65-79.
- Szostak JW & Huizenga DE (1995) A DNA Aptamer that Binds Adenosine and ATP. *Biochemistry (Wash.)* 34:656-665.
- Ussery DW (2002) DNA Structure: A-, B- and Z-DNA Helix Families. in *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, Édit Macmillan Publishers Ltd (Nature Publishing Group).

Wang YM, Pang XF & Zhang YY (2009) Recent advances in fiber-optic DNA biosensors. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 02(05):312-317.

WHO Technical Report Series W (2012) End of Ebola outbreak in Uganda.

Yanik AA, Huang M, Kamohara O, Artar A, Geisbert TW, Connor JH & Altug H (2010) An optofluidic nanoplasmonic biosensor for direct detection of live viruses from biological media. *Nano Lett.* 10(12):4962-4969.

Zammatteo N, Jeanmart L, Hamels S, Courtois S, Louette P, Hevesi L & Remacle J (2000) Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Anal. Biochem.* 280(1):143-150.

<http://www.aids.gov>

<http://www.ictvonline.org>

<http://viralzone.expasy.org>

<http://www.who.int>