

**THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité : Chimie Analytique  
Ecole Doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre  
(ED388)

Présentée par :  
**Marie GIRARDOT**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

**Aptamères et électrophorèse capillaire : caractérisation physico-chimique  
d'aptamères libres en solution ou greffés sur des nanoparticules, et étude de  
leur affinité avec une cible protéique en vue de leur emploi pour des  
méthodes sensibles de diagnostic**

Soutenance prévue le 20 octobre 2010

Devant le jury composé de :

Pr. Valérie CABUIL  
Dr. Régis DANIEL  
Pr. Eric PEYRIN  
Dr. Loïc AUVRAY  
Dr. Stéphanie DESCROIX  
Pr. Anne VARENNE

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse

# Table des matières

<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>2</b>
<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>12</b>

## CHAPITRE I : Revue bibliographique

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>20</b>
<b>I. STRUCTURE ET PROPRIETES DES APTAMERES</b> .....	<b>22</b>
I. 1. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES .....	22
I. 1. 1. <i>De la structure secondaire à l'arrangement suprahélicoïdal</i> .....	23
I. 1. 2. <i>Eléments structuraux de base</i> .....	23
I. 1. 3. <i>Aptamères ADN ou ARN</i> .....	25
I. 1. 4. <i>Structure du complexe aptamère – cible</i> .....	25
I. 2. PROPRIETES GENERALES DES APTAMERES .....	26
I. 2. 1. <i>Avantages par rapport aux anticorps</i> .....	26
I. 2. 2. <i>Affinité et spécificité</i> .....	27
<b>II. OBTENTION DES APTAMERES : LA METHODE SELEX OU EVOLUTION MOLECULAIRE DIRIGEE</b> .....	<b>29</b>
II. 1. PRINCIPE GENERAL .....	29
II. 2. CREATION D'UNE BANQUE D'OLIGONUCLEOTIDES .....	30
II. 2. 1. <i>Nature chimique des acides nucléiques</i> .....	30
II. 2. 2. <i>Diversité moléculaire</i> .....	31
II. 3. CHOIX ET OPTIMISATION DE LA METHODE DE SELECTION .....	32
II. 4. MODIFICATIONS CHIMIQUES .....	32
II. 4. 1. <i>Utilisation d'analogues modifiés</i> .....	33
II. 4. 2. <i>Elaboration d'aptamères énantiomères (spiegelmers)</i> .....	33
II. 5. MODIFICATIONS DU PROCEDE SELEX.....	34
II. 5. 1. <i>Utilisation de l'électrophorèse capillaire</i> .....	35
II. 5. 1. 1. <i>CE-SELEX</i> .....	36
II. 5. 1. 2. <i>Sélection de « smart aptamers » par électrophorèse capillaire cinétique (KCE)</i> .....	39
II. 5. 1. 3. <i>Sélection non-SELEX</i> .....	43
II. 5. 2. <i>Tailored-SELEX</i> .....	44
II. 5. 3. <i>« Toggle » SELEX</i> .....	44
II. 5. 4. <i>Expression cassette SELEX</i> .....	45
II. 5. 5. <i>SELEX génomique</i> .....	45
II. 5. 6. <i>Photo-SELEX (SELEX covalent)</i> .....	46
II. 5. 7. <i>SELEX automatisé</i> .....	47
II. 5. 8. <i>AFM-SELEX</i> .....	48
II. 6. EXEMPLES DE SELECTION .....	49
<b>III. APPLICATIONS</b> .....	<b>52</b>
III. 1. APPLICATIONS THERAPEUTIQUES .....	52
III. 1. 1. <i>Régulation de l'expression génique</i> .....	53
III. 1. 2. <i>Inhibition protéique intracellulaire</i> .....	54
III. 1. 3. <i>Inhibition de cibles extracellulaires</i> .....	54
III. 1. 4. <i>Vectorisation de molécules actives</i> .....	56

III. 2. APPLICATIONS ANALYTIQUES ET DIAGNOSTIC .....	57
III. 2. 1. <i>Techniques bioanalytiques</i> .....	57
III. 2. 1. 1. <i>Essais bioanalytiques de type ELISA</i> .....	57
III. 2. 1. 2. <i>Détection par PCR d'affinité</i> .....	60
III. 2. 2. <i>Techniques séparatives</i> .....	61
III. 2. 2. 1. <i>Chromatographie</i> .....	61
III. 2. 2. 2. <i>Electrophorèse capillaire</i> .....	63
III. 2. 2. 3. <i>Electrochromatographie</i> .....	74
III. 2. 3. <i>Biocapteurs et bioessais</i> .....	76
III. 2. 3. 1. <i>Aptasenseurs optiques</i> .....	77
III. 2. 3. 2. <i>Aptasenseurs électrochimiques</i> .....	92
III. 2. 3. 3. <i>Aptasenseurs acoustiques</i> .....	98
III. 2. 4. <i>Liste non exhaustive des applications analytiques utilisant des aptamères</i> .....	100
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>104</b>

## CHAPITRE II : Modifications de surface pour la caractérisation du lysozyme par électrophorèse capillaire

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>112</b>
<b>1. DESCRIPTION ET PROPRIETES DU LYSOZYME</b> .....	<b>113</b>
<b>2. MODIFICATIONS DE LA PAROI INTERNE DES CAPILLAIRES POUR L'ETUDE DE PROTEINES PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE</b> .....	<b>115</b>
2. 1. <b>MECANISME D' ADSORPTION DES PROTEINES SUR LA SURFACE DU CAPILLAIRE EN SILICE</b> .....	115
2. 2. <b>MODIFICATION DYNAMIQUE DE LA SURFACE DU CAPILLAIRE</b> .....	117
2. 2. 1. <i>Additifs de faible masse moléculaire</i> .....	118
2.2.1.1. <i>Amines cationiques</i> .....	118
2.2.1.2. <i>Tensioactifs neutres ou cationiques</i> .....	119
2. 2. 2. <i>Polymères solubles</i> .....	120
2.2.2.1. <i>Polymères neutres</i> .....	121
2.2.2.2. <i>Polymères chargés</i> .....	122
2. 3. <b>MODIFICATION PERMANENTE DE LA SURFACE DU CAPILLAIRE</b> .....	123
2. 3. 1. <i>Adsorption physique</i> .....	123
2. 3. 2. <i>Greffage chimique covalent</i> .....	125
<b>3. CARACTERISATION DU LYSOZYME PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DE ZONE (CZE)</b> .....	<b>128</b>
3. 1. <b>INFLUENCE DU pH DE L' ELECTROLYTE DE SEPARATION</b> .....	128
3.1.1. <i>Analyse du lysozyme à pH acide</i> .....	128
3.1.2. <i>Analyse du lysozyme à pH basique</i> .....	130
3. 2. <b>MODIFICATION DE LA PAROI DU CAPILLAIRE</b> .....	130
3.2.1. <i>Modification dynamique</i> .....	131
3.2.1.1. <i>Modification dynamique par un polymère cationique, le polybrène</i> .....	131
3.2.1.2. <i>Modification dynamique par un polymère neutre, l'oxyde de polyéthylène</i> .....	132
3.2.2. <i>Modification permanente par un polymère neutre</i> .....	137
3.2.2.1. <i>Modification permanente par l'hydroxypropylcellulose</i> .....	137
3.2.2.2. <i>Modification permanente par l'alcool polyvinylique</i> .....	146
3. 3. <b>PRECONDITIONNEMENT ACIDE DU CAPILLAIRE (PHENOMENE D'HYSTERESE DE PH)</b> .....	148
3.3.1. <i>Influence du pH de l'électrolyte (gamme pH 3 – 7)</i> .....	149
3.3.2. <i>Optimisation de l'analyse du lysozyme à pH 5,7</i> .....	152
3.3.2.1. <i>Influence du volume d'injection du lysozyme</i> .....	152
3.3.2.2. <i>Influence du temps de préconditionnement acide</i> .....	154
3.3.2.3. <i>Influence du temps de préconditionnement de l'électrolyte</i> .....	155
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>157</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>158</b>

## **CHAPITRE III : Caractérisation de l'aptamère anti-lysozyme par électrophorèse capillaire**

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>162</b>
<b>2. ARTICLE .....</b>	<b>165</b>
<b>3. CONCLUSION.....</b>	<b>187</b>
<b>4. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>188</b>

## **CHAPITRE IV : Etude de l'interaction aptamère – protéine par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) et analyse frontale électrocinétique continue en électrophorèse capillaire (FACCE) ou microsysteme (FACMCE)**

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>191</b>
<b>1. CONTEXTE DE L'ETUDE .....</b>	<b>192</b>
<b>2. ARTICLE 1 : MISE AU POINT DE LA METHODOLOGIE FACMCE DANS LE CAS DU LYSOZYME ET DE SON APTAMERE .....</b>	<b>195</b>
2.1. INTRODUCTION.....	195
2.2. ARTICLE .....	197
2.3. CONCLUSION .....	216
<b>3. ARTICLE 2 : INFLUENCE DES CONDITIONS DE MILIEU ET DE PREPARATION DE L'ECHANTILLON SUR LES PARAMETRES D'INTERACTION DU SYSTEME LYSOZYME/APTAMERE .....</b>	<b>217</b>
3.1. INTRODUCTION.....	217
3.2. ARTICLE .....	218
3.3. CONCLUSION .....	235
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>236</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>238</b>

## **CHAPITRE V : Caractérisation de nanoparticules fonctionnalisées par l'aptamère anti-lysozyme**

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>241</b>
<b>1. CARACTERISATION PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DE ZONE DE NANOPARTICULES FONCTIONNALISEES PAR L'APTAMERE ANTI-LYSOZYME .....</b>	<b>243</b>
1.1. INTRODUCTION.....	243
1.2. ARTICLE .....	244
1.3. CONCLUSION .....	268
<b>2. CARACTERISATION DE L'AFFINITE DE NANOPARTICULES FONCTIONNALISEES PAR L'APTAMERE ANTI-LYSOZYME.....</b>	<b>269</b>

2.1. FONCTIONNALISATION DE NANOPARTICULES PAR L'APTAMERE ANTI-LYSOZYME ET CARACTERISATION PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE .....	269
2.1.1. <i>Fonctionnalisation des nanoparticules</i> .....	270
2.1.2. <i>Détermination du taux de greffage</i> .....	271
2.1.2.1. <i>Etalonnage de l'aptamère amino-modifié en CZE et FACCE</i> .....	271
2.1.2.2. <i>Dosage de l'aptamère libre dans le surnageant et détermination du taux de greffage</i> .....	272
2.1.3. <i>Détermination de la taille des nanoparticules</i> .....	273
2.1.4. <i>Influence des paramètres opératoires sur le comportement électrophorétique des nanoparticules</i> 274	
2.1.4.1. <i>Influence de la force ionique</i> .....	274
2.1.4.2. <i>Influence du champ électrique</i> .....	276
2.1.4.3. <i>Influence de la température</i> .....	277
2.1.5. <i>Conclusion</i> .....	278
2.2. ETUDE DE L'INTERACTION LYSOZYME – NANOPARTICULE FONCTIONNALISEE PAR L'APTAMERE PAR ANALYSE FRONTALE ELECTROKINETIQUE CONTINUE EN MICROSYSTEME (FACMCE) .....	279
2.2.1. <i>Conditions opératoires</i> .....	279
2.2.2. <i>Etalonnage de la hauteur du palier de concentration de l'aptamère greffé par FACMCE</i> .....	280
2.2.3. <i>Etude de l'interaction lysozyme – nanoparticule fonctionnalisée par l'aptamère par FACMCE</i> ...	281
2.2.3.1. <i>Détermination des paramètres d'interaction</i> .....	281
2.2.3.2. <i>Test de spécificité</i> .....	284
2.3. CONCLUSION .....	284
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>285</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>286</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	<b>288</b>

# Abréviations

## A

---

<b>A</b>	Adénine
<b>A<math>\beta</math></b>	$\beta$ -protéine amyloïde ( <i>Amyloid <math>\beta</math>-protein</i> )
<b>ACE</b>	Electrophorèse capillaire d'affinité ( <i>Affinity Capillary Electrophoresis</i> )
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADP</b>	Adénosine diphosphate
<b>AFM</b>	Microscopie à force atomique ( <i>Atomic Force Microscopy</i> )
<b>AL</b>	Aptamère anti-lysozyme
<b>AMP</b>	Adénosine monophosphate
<b>AMV</b>	Virus du myéloblastome aviaire ( <i>Avian Myeloblastosis Virus</i> )
<b>APCE</b>	Electrophorèse capillaire avec sonde d'affinité ( <i>Affinity Probe Capillary Electrophoresis</i> )
<b>Arg</b>	Arginine
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messager
<b>AT</b>	Aptamère anti-thrombine
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>AuNP</b>	Nanoparticule d'or

## B

---

<b>bFGF</b>	Facteur de croissance basique des fibroblastes ( <i>basic Fibroblast Growth Factor</i> )
<b>BGE</b>	Electrolyte de séparation ( <i>Background Electrolyte</i> )
<b>BM</b>	Bleu de méthylène
<b>BrdU</b>	5-bromo-2'-désoxyuridine
<b>BSA</b>	Albumine de sérum bovin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )

## C

---

<b>C</b>	Cytosine
<b>CE</b>	Electrophorèse capillaire ( <i>Capillary Electrophoresis</i> )
<b>CEC</b>	Electrochromatographie ( <i>Capillary ElectroChromatography</i> )
<b>CGE</b>	Electrophorèse capillaire en gel ( <i>Capillary Gel Electrophoresis</i> )
<b>CGRP</b>	Peptide associé au gène de la calcitonine ( <i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i> )

<b>CIEF</b>	Focalisation isoélectrique capillaire ( <i>Capillary Isoelectric Focalization</i> )
<b>CL</b>	Chimiluminescence
<b>CMC</b>	Concentration micellaire critique
<b>CTAB</b>	Bromure de céthyltriméthylammonium ( <i>Cethyltrimethylammonium Bromide</i> )
<b>CV</b>	Coefficient de variation
<b>CZE</b>	Electrophorèse capillaire de zone ( <i>Capillary Zone Electrophoresis</i> )

## D

---

<b>D</b>	Dextrogyre
<b>DDAB</b>	Bromure de didodécyl diméthylammonium ( <i>Didodecyldimethylammonium Bromide</i> )
<b>DMLA</b>	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
<b>DPV</b>	Voltamétrie à impulsion différentielle ( <i>Differential Pulse Voltammetry</i> )

## E

---

<b>ECEEM</b>	Electrophorèse capillaire en équilibre de mélanges en équilibre ( <i>Equilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures</i> )
<b>ELISA</b>	Dosage immunoenzymatique sur support solide ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
<b>ELONA</b>	Dosage oligoenzymatique sur support solide ( <i>Enzyme-Linked Oligonucleotide Assay</i> )
<b>ESI</b>	Ionisation par électronébulisation ( <i>Electrospray Ionization</i> )

## F

---

<b>FACCE</b>	Analyse frontale électrocinétique continue en capillaire ( <i>Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis</i> )
<b>FACMCE</b>	Analyse frontale électrocinétique continue en microsystème ( <i>Frontal Analysis Continuous Microchip Electrophoresis</i> )
<b>FACSI</b>	Injection continue de l'échantillon par amplification du champ électrique ( <i>Field-Amplified Continuous Sample Injection</i> )
<b>FAD</b>	Flavine adénine dinucléotide
<b>FASS</b>	Préconcentration par amplification du champ électrique ( <i>Field-Amplified Sample Stacking</i> )
<b>FI</b>	Force ionique
<b>FITC</b>	Isothiocyanate de fluorescéine ( <i>Fluoresceine Isothiocyanate</i> )
<b>FMN</b>	Flavine mononucléotide

**FRET** Transfert d'énergie par résonance de type Förster (*Förster Resonance Energy Transfer*)

## G

---

**G** Guanine  
**GA** Glutaraldéhyde  
**GC** Chromatographie gazeuse (*Gas Chromatography*)  
**GDH** Glucose déshydrogénase  
**GnRH** Gonadolibérine (*Gonadotropin-Releasing Hormone*)  
**GPTS** Glycidoxypropyltriméthoxysilane

## H

---

**HAP** Hydrocarbure aromatique polycyclique  
**HAS** Albumine de sérum humain (*Human Serum Albumine*)  
**HEC** Hydroxyéthylcellulose  
**HPC** Hydroxypropylcellulose  
**HPMC** Hydroxypropylméthylcellulose  
**HRP** Peroxydase du raifort (*Horseradish Peroxidase*)

## I

---

**Ig** Immunoglobuline  
**IgE** Immunoglobuline E  
**IMPDH** Ionosine monophosphate déshydrogénase  
**IS** Force ionique (*Ionic Strength*)

## K

---

**KCE** Electrophorèse capillaire cinétique (*Kinetic Capillary Electrophoresis*)  
**K<sub>d</sub>** Constante d'équilibre de dissociation  
**k<sub>off</sub>** Constante cinétique monomoléculaire de dissociation  
**k<sub>on</sub>** Constante cinétique bimoléculaire de formation

## L

---

**L** Lévogyre  
**LgA** β-lactoglobuline bovine A

<b>LgB</b>	$\beta$ -lactoglobuline bovine B
<b>LIF</b>	Fluorescence induite par laser ( <i>Laser-Induced Fluorescence</i> )
<b>LIFP</b>	Anisotropie de fluorescence induite par laser ( <i>Laser-Induced Fluorescence Anisotropy</i> )
<b>LOD</b>	Limite de détection ( <i>Limit Of Detection</i> )
<b>LS</b>	L-sélectine humaine
<b>Lyso</b>	Lysozyme

## M

---

<b>MAPS</b>	Méthacryloxypropyltriméthoxysilane
<b>MCE</b>	Electrophorèse sur micropuce ( <i>Microchip Electrophoresis</i> )
<b>MCQ</b>	Microbalance à cristal de quartz
<b>MIP</b>	Polymère à empreinte moléculaire ( <i>Molecular Imprinted Polymer</i> )
<b>M<sub>m</sub></b>	Masse moléculaire
<b>MMLV</b>	Virus de la leucémie murine ( <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i> )
<b>MN</b>	Marqueur neutre
<b>MOPS</b>	Acide 3-(N-morpholine)propanesulfonique ( <i>3-(N-morpholine)propanesulfonic acid</i> )
<b>MS</b>	Spectrométrie de masse ( <i>Mass Spectrometry</i> )

## N

---

<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamide adénine dinucléotide
<b>NECEEM</b>	Electrophorèse capillaire hors équilibre de mélanges en équilibre ( <i>Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures</i> )
<b>NP</b>	Nanoparticule
<b>NPY</b>	Neuropeptide Y
<b>NTC</b>	Nanotube de carbone

## P

---

<b>PB</b>	Polybrène (= bromure d'hexadiméthrine)
<b>PCR</b>	Réaction en chaîne par polymérase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PDGF</b>	Facteur de croissance dérivé des plaquettes ( <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> )
<b>PDMA</b>	Polydiméthyl acrylamide
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol)
<b>PEI</b>	Polyéthylène imine
<b>PEO</b>	Oxyde de polyéthylène ( <i>Polyethylene Oxide</i> )
<b>pI</b>	Point isoélectrique

<b>Poly-A</b>	Poly-adénine
<b>PTFase</b>	Protéine farnesyltransférase
<b>PtNP</b>	Nanoparticule de platine
<b>PTPase</b>	Protéine tyrosine phosphatase
<b>PVA</b>	Polyvinyl alcool
<b>PVP</b>	Polyvinyl pyrrolidone
<b>PVS</b>	Sulfonate de polyvinyle ( <i>Polyvinyl Sulfonate</i> )

## Q

---

<b>QD</b>	Point quantique ( <i>Quantum Dot</i> )
-----------	--

## R

---

<b>RCA</b>	Amplification par cercle roulant ( <i>Rolling Circle Amplification</i> )
<b>RET</b>	Récepteur à activité tyrosine kinase oncogénique
<b>RG19</b>	Reactive green 19
<b>RLAA</b>	<i>Reporter-Linked Aptamer Assay</i>
<b>RMN</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>RPS</b>	Résonance plasmonique de surface
<b>RSV</b>	Virus sarcome de Rous ( <i>Rous Sarcoma Virus</i> )
<b>RT</b>	Transcriptase inverse ( <i>Reverse Transcriptase</i> )

## S

---

<b>SAH</b>	S-adénosylhomocystéine
<b>SAW</b>	Onde acoustique de surface ( <i>Surface Acoustic Wave</i> )
<b>SB</b>	Sulfobétaïne
<b>SDS</b>	Dodécylsulfate de sodium ( <i>Sodium Dodecylsulfate</i> )
<b>SELEX</b>	Evolution de ligands par enrichissement exponentiel ( <i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment</i> )
<b>SIM</b>	Détection en mode d'ion sélectionné ( <i>Single Ion Monitoring</i> )
<b>SMIL</b>	<i>Successive Multiple Ionic Polymer Layer</i>

## T

---

<b>T</b>	Thymine
<b>TAR</b>	Sensible à la transactivation ( <i>Trans-Activation Responsive</i> )
<b>TEA</b>	Triéthylamine
<b>TEC</b>	Transistor à effet de champ

<b>TEPA</b>	Tétraéthylène pentamine
<b>TGF</b>	Focalisation par gradient de température ( <i>Temperature Gradient Focusing</i> )
<b>Thr</b>	Thrombine
<b>TMR</b>	Tetraméthyl rhodamine
<b>Tris</b>	Tris(hydroxyméthyl)aminoéthane
<b>Trp</b>	Tryptophane
<b>TTF</b>	Facteur de transcription thyroïdien ( <i>Thyroid Transcription Factor</i> )

## U

---

<b>UV</b>	Ultra-violet
-----------	--------------

## V

---

<b>VEGF</b>	Facteur de croissance endothéliale vasculaire ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
<b>VI</b>	Vinylimidazole
<b>VIH-1</b>	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
<b>VP</b>	Vinylpyrrolidone

# Introduction générale

Développés simultanément par plusieurs laboratoires dans les années 1990, les aptamères sont de courtes séquences oligonucléotidiques (ADN simple brin ou ARN) qui présentent une affinité spécifique pour des cibles variées, allant des petites molécules aux protéines, voire aux cellules entières [1-3]. Ces molécules synthétiques sont isolées à partir de banques aléatoires via une technique de sélection *in vitro* baptisée SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) [4-6]. Tout comme les anticorps, les aptamères permettent la reconnaissance moléculaire d'une cible donnée, et offrent en outre un certain nombre d'avantages : affinité élevée et stabilité thermique accrue, tolérance à de larges gammes de pH et de concentration saline, faible coût, simplicité de synthèse et de marquage. Du fait de ces propriétés remarquables, les aptamères peuvent être employés dans le cadre de nombreuses applications impliquant un phénomène de reconnaissance moléculaire, notamment comme agents thérapeutiques ou de diagnostic, ou comme outils pour la recherche biomédicale [7-10]. Ils sont également depuis plus récemment utilisés comme alternative aux anticorps dans des applications analytiques (essais bioanalytiques de type ELISA [11-13], techniques séparatives [9,14-23], biocapteurs appelés « aptasenseurs » [24-28]), en tant que ligands immobilisés ou dans des dosages en phase homogène. En vue de l'élaboration de systèmes performants, les aptamères peuvent être greffés sur des nanoparticules (NPs) de différentes sortes (NPs d'oxyde de fer [29-31], NPs fluorescentes [30], NPs d'or [32-34]), essentiellement pour des applications biomédicales, en particulier pour le dépistage et le traitement du cancer (purification [29], collection [29,35], détection [29,32,35] et amplification [33,34,36] du signal de protéines ou cellules-cibles, ciblage [37], imagerie et thérapie [31]).

L'étude des interactions moléculaires ou biomoléculaires non covalentes présente un intérêt élevé pour l'élucidation des processus biologiques, tant dans le domaine thérapeutique et du diagnostic que pour le développement de méthodes bioanalytiques sélectives et sensibles. Dans le but d'accroître le développement et l'usage d'aptamères dans une grande variété de domaines, il est nécessaire de développer des méthodes permettant une détermination simple, rapide et précise des paramètres d'interaction aptamère-cible (constante de dissociation et stoechiométrie). Les méthodes disponibles pour l'étude des interactions

biomoléculaires incluent la spectroscopie, la chromatographie d'exclusion, la microdialyse, la calorimétrie isotherme, la résonance plasmonique de surface et les techniques séparatives telles que l'électrophorèse sur gel ou l'électrophorèse capillaire (CE) [40-42]. Parmi ces méthodes, l'électrophorèse capillaire est une méthode analytique séparative permettant la séparation de composés ionisés ou ionisables sous l'application d'un champ électrique. La séparation est réalisée dans un capillaire en silice vierge de faible diamètre interne (10 à 100  $\mu\text{m}$  classiquement), dont la paroi peut éventuellement être modifiée par des polymères. Le faible diamètre du capillaire permet une réduction et une meilleure dissipation de la chaleur produite par effet Joule, ainsi que la suppression quasi-totale des phénomènes de convection. Des efficacités élevées sont obtenues lors de la séparation des analytes, tout en utilisant d'infimes quantités d'échantillon (de l'ordre de quelques nanolitres) et des volumes extrêmement faibles de produits chimiques. L'électrophorèse capillaire semble donc une méthode de choix pour une caractérisation complète d'un système aptamère/cible en vue de l'emploi des aptamères comme outils de reconnaissance moléculaire pour différentes applications dont le diagnostic. Ainsi, elle semble adéquate pour (1) la caractérisation physico-chimique et la quantification de l'aptamère et de sa cible et (2) la caractérisation de l'interaction aptamère/cible via la détermination des paramètres cinétiques et thermodynamiques de l'interaction et (3) la mise en œuvre du diagnostic à proprement parler. La littérature existant dans ce domaine comporte quelques articles traitant essentiellement de la détection et/ou la quantification d'analytes d'intérêt (cibles) par APCE (affinity probe capillary electrophoresis), technique consistant à injecter directement un mélange pré-incubé de l'aptamère (sonde d'affinité) et de la cible [17,19,38-40].

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés durant ces travaux de thèse à la caractérisation physico-chimique par électrophorèse capillaire d'aptamères libres en solution ou greffés sur des nanoparticules, et à l'étude de leur affinité pour leur cible en vue de leur emploi pour des méthodes sensibles de diagnostic. Notre choix s'est porté sur des cibles de nature protéique, dont la détection et/ou la quantification présentent un grand intérêt pour différentes applications (diagnostic, applications thérapeutiques...). Nous nous sommes en particulier intéressés au lysozyme, protéine pour laquelle un aptamère a été identifié [41] mais n'ayant fait l'objet d'aucune étude par électrophorèse capillaire.

Le lysozyme, hydrolase acide synthétisée dans les globules blancs, participe à la défense immunitaire en détruisant les cellules bactériennes par hydrolyse du peptidoglycane des parois cellulaires [42]. Le lysozyme est présent dans de nombreux tissus et liquides

biologiques (larmes, salive, sérum sanguin...) ainsi que dans le blanc d'œuf, où il représente environ 3% de l'ensemble des protéines présentes. L'activité du lysozyme peut être inhibée par différents composés, entre autre les surfactants comme le dodécylsulfate de sodium (SDS) [42]. Le dosage du lysozyme dans le sérum sanguin permet de contrôler l'efficacité du traitement de certaines maladies sanguines comme la leucémie, d'orienter le diagnostic en néphrologie, et participe à la surveillance du rejet de greffe d'organes [43]. Le lysozyme est également utilisé pour le traitement des blessures et des infections, du fait de ses propriétés anti-inflammatoires, et pour la conservation des aliments, du fait des ses propriétés antibactériennes [44]. Dans le domaine agro-alimentaire, le lysozyme est notamment employé comme additif pour la conservation des fromages à pâte cuite [45] ou des vins [46]. Cependant, le lysozyme est un allergène majeur de l'œuf : des études cliniques ont révélé que des quantités infimes de lysozyme pouvaient causer des réactions allergiques [47]. Il est donc indispensable de pouvoir détecter la présence de lysozyme dans les produits destinés à la consommation des patients allergiques. Actuellement, seul un test par immunodosage ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilisant des anticorps est disponible commercialement (Calbiotech Inc., Spring Valley, CA, USA) ; malgré sa sensibilité (0,021 ng/mL), ce type de test présente néanmoins un certain nombre d'inconvénients (succession d'étapes fastidieuses, temps de réaction élevé, utilisation de réactifs coûteux...) [48]. Il semble donc intéressant de développer un nouveau système de diagnostic pour cette protéine.

L'aptamère dirigé contre le lysozyme est un oligonucléotide ADN de 30 bases dont voici la séquence : 5'-ATC AGG GCT AAA GAG TGC AGA GTT ACT TAG-3'. Cet aptamère, sélectionné par SELEX automatisé [41], a été employé pour l'élaboration d'un aptasenseur pour la détection voltamétrique du lysozyme [27]. Cependant, aucune étude n'a rapporté sa caractérisation ainsi que l'étude de son interaction avec le lysozyme.

Le choix du lysozyme comme cible a impliqué un degré de difficulté supplémentaire durant cette étude, car il s'agit d'une protéine fortement basique impliquant une mise en œuvre délicate des séparations électrophorétiques. En effet, ayant un pI de 11,35, le lysozyme est chargé positivement à pH physiologique et peut s'adsorber sur les parois du capillaire via des interactions hydrophobes et électrostatiques, entraînant une perturbation de l'interaction. Ainsi, les développements méthodologiques mis au point avec ce système très complexe pourront a posteriori être employés plus facilement pour des systèmes nécessitant une mise en œuvre plus aisée. Durant nos travaux, deux approches ont été abordées en vue de l'élaboration de nouveaux outils de bio-reconnaissance moléculaire : l'emploi d'aptamères libres en

solution ou greffés sur des nanoparticules. Ce mémoire décrit ainsi les travaux effectués dans ce contexte, s'articulant autour de cinq chapitres selon le plan décrit ci-après.

La première partie de la thèse est consacrée à une étude bibliographique. Après avoir décrit la structure et les propriétés des aptamères, nous présentons leurs conditions d'obtention par évolution moléculaire dirigée ainsi qu'un aperçu des cibles utilisées pour la sélection d'aptamères. La dernière partie de ce chapitre est consacrée à une revue détaillée des différentes applications impliquant des aptamères : applications thérapeutiques, applications analytiques et bioanalytiques puis élaboration de biocapteurs.

Le deuxième chapitre traite de la caractérisation de la cible choisie, le lysozyme, par électrophorèse capillaire de zone (CZE). Du fait de la forte basicité de cette protéine ( $pI > 11$ ), son étude par électrophorèse capillaire nécessite un traitement spécifique de la paroi du capillaire afin de limiter les phénomènes d'adsorption. Après une présentation des différentes modifications de capillaire employées pour l'analyse de protéines, différents traitements de surface du capillaire ont été évalués pour la caractérisation du lysozyme par CZE, les conditions optimales choisies devant également être compatibles avec l'analyse de l'aptamère.

La reconnaissance de la cible par l'aptamère met en jeu un certain nombre d'interactions (interactions électrostatiques ou d'empilement, liaisons hydrogènes) et dépend donc fortement de la conformation de l'aptamère. Celle-ci peut être influencée par l'environnement, et notamment par la présence de divers cations. Depuis plusieurs années, une attention particulière s'est portée sur l'étude de l'interaction de cations métalliques divalents avec l'ADN, ou plus généralement, avec des oligonucléotides, en présence ou absence de contre-ions monovalents, du fait de l'importance de ce phénomène du point de vue biologique et théorique [49]. Le troisième chapitre, traité sous forme d'article, est donc consacré à l'étude par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) de l'interaction entre l'aptamère anti-lysozyme et divers cations monovalents (sodium, potassium, césium) ou divalents (magnésium, calcium, barium), afin de mettre en évidence un éventuel changement de conformation de l'aptamère, pouvant influencer sur l'interaction aptamère-cible. Les effets de force ionique et de condensation de contre-ions ont été évalués selon les modèles de Friedl et Manning afin de mettre en évidence l'existence d'autres phénomènes, comme d'éventuels changements de conformation de l'aptamère ou des interactions avec les constituants de l'électrolyte. Les corrections ainsi apportées aux données expérimentales permettront de poursuivre l'interprétation afin de mieux comprendre les phénomènes impliqués dans l'interaction aptamère/cation.

L'étude de l'interaction entre l'aptamère libre en solution et la cible protéique est abordée dans le quatrième chapitre. Afin de pallier les problèmes liés à la faible sensibilité de la détection UV, une méthode d'analyse frontale électrocinétique en microsystème (FACMCE, frontal analysis continuous microchip electrophoresis) avec détection de fluorescence a été développée. Le développement de cette méthode et la détermination des paramètres de l'interaction aptamère – lysozyme dans un électrolyte classique sont traités sous forme d'un premier article. Comme l'influence de la nature de l'électrolyte de séparation sur la mobilité électrophorétique de l'aptamère et donc sur une évolution probable de la conformation de l'aptamère a été montrée dans le chapitre précédent, nous nous sommes dans un deuxième temps intéressés à la détermination des paramètres d'interaction du système aptamère/lysozyme sous différentes conditions expérimentales (nature de l'électrolyte de séparation, force ionique, présence d'un cation divalent) afin de compléter les informations obtenues dans le chapitre précédent. Ces résultats sont présentés dans un deuxième article.

Enfin, le dernier chapitre traite du développement de l'emploi d'aptamères greffés sur des nanoparticules comme outils de bio-reconnaissance. Des nanoparticules magnétiques cœur/coquille de taille sub-nanométrique portant des chaînes polyéthylène glycol (PEG) et acide carboxylique ont été fonctionnalisées par l'aptamère anti-lysozyme modifié en 5' par un groupement amine primaire, via la formation d'une liaison amide. Le premier paragraphe, traité sous forme d'article, présente la caractérisation par électrophorèse capillaire de zone (CZE) des objets obtenus en terme de taux de greffage, de taille, de comportement électrophorétique et de stabilité colloïdale. Nous avons ensuite étudié l'interaction entre l'aptamère greffé sur les nanoparticules et sa cible, le lysozyme, afin de mettre en lumière l'influence de l'immobilisation de l'aptamère sur son affinité. La détermination des paramètres de l'interaction est effectuée par FACMCE, selon la procédure développée pour l'étude de l'interaction aptamère libre – lysozyme. Ces résultats ont ainsi pu mettre en évidence une utilisation possible des aptamères comme outils biologiques, autant libres en solution que greffés sur des nanoparticules.

## Références bibliographiques

- [1] M. Famulok, G. Mayer, M. Blind, *Accounts of Chemical Research* 33 (2000) 591.
- [2] S.D. Jayasena, *Clinical Chemistry* 45 (1999) 1628.
- [3] T. Mairal, V.C. Özalp, P.L. Sánchez, M. Mir, I. Katakis, C.K. O'Sullivan, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390 (2008) 989.
- [4] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, *Biomolecular Engineering* 24 (2007) 381.
- [5] C.L.A. Hamula, J.W. Guthrie, H. Zhang, X.-F. Li, X.C. Le, *Trends in Analytical Chemistry* 25 (2006) 681.
- [6] T. Sampson, *World Patent Information* 25 (2003) 123.
- [7] R.K. Mosing, M.T. Bowser, *Journal of Separation Science* 30 (2007) 1420.
- [8] M. Famulok, J.S. Hartig, G. Mayer, *Chemical Reviews* 107 (2007) 3715.
- [9] C. Ravelet, C. Grosset, E. Peyrin, *Journal of Chromatography A* 1117 (2006) 1.
- [10] S. Song, L. Wang, J. Li, J. Zhao, C. Fan, *Trends in Analytical Chemistry* 27 (2008) 108.
- [11] D.W. Drolet, L. Moon-McDermott, T.S. Romig, *Nature Biotechnology* 14 (1996) 1021.
- [12] N. Kawazoe, Y. Ito, Y. Imanishit, *Biotechnology Progress* 13 (1997) 873.
- [13] E. Baldrich, J.L. Acero, G. Reekmans, W. Laureyn, C.K. O'Sullivan, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 4774.
- [14] Q. Deng, I. German, D. Buchanan, R.T. Kennedy, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 5415.
- [15] A. Brumbt, C. Ravelet, C. Grosset, A. Ravel, A. Villet, E. Peyrin, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 1993.
- [16] C. Ravelet, R. Boulkedid, A. Ravel, C. Grosset, A. Villet, J. Fize, E. Peyrin, *Journal of Chromatography A* 1076 (2005) 62.
- [17] I. German, D.D. Buchanan, R.T. Kennedy, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 4540.
- [18] Q. Deng, C.J. Watson, R.T. Kennedy, *Journal of Chromatography A* 1005 (2003) 123.
- [19] V. Pavski, X.C. Le, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 6070.
- [20] J. Ruta, C. Ravelet, I. Baussanne, J.-L. Décout, E. Peyrin, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 4716.
- [21] J. Ruta, C. Ravelet, I. Baussane, J. Fize, J.-L. Décout, E. Peyrin, *Journal of Separation Science* 31 (2008) 2239.
- [22] M. Berezovski, R. Nutiu, Y. Li, S.N. Krylov, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 1382.
- [23] M.A. Rehder, L.B. McGown, *Electrophoresis* 22 (2001) 3759.
- [24] G.M. Hieftje, R.A. Potyrailo, R.C. Conrad, A.D. Ellington, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 3419.
- [25] T.G. McCauley, N. Hamaguchia, M. Stanton, *Analytical Biochemistry* 319 (2003) 244.
- [26] O'Sullivan, C. K., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 372 (2002) 44.
- [27] A.K.H. Cheng, B. Ge, H.-Z. Yu, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 5158.

- [28] M. Minunni, S. Tombelli, S. Gulotto, A. Luzi, M. Mascini, *Biosensors & Bioelectronics* 20 (2004) 1149.
- [29] M.B. Murphy, S.T. Fuller, P.M. Richardson, S.A. Doyle, *Nucleic Acids Research* 31 (2003) e110.
- [30] J.K. Herr, J.E. Smith, C.D. Medley, D. Shangguan, W. Tan, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 2918.
- [31] A.Z. Wang, V. Bagalkot, C.C. Vasilliou, F. Gu, F. Alexis, L. Zhang, M. Shaikh, K. Yuet, M.J. Cima, R. Langer, P.W. Kantoff, N.H. Bander, S. Jon, O.C. Farokhzad, *ChemMedChem* 3 (2008) 1311.
- [32] C.-C. Huang, Y.-F. Huang, Z. Cao, W. Tan, H.-T. Chang, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 5735.
- [33] P. He, L. Shen, Y. Cao, D. Li, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 8024.
- [34] V. Pavlov, Y. Xiao, B. Shlyahovsky, I. Willner, *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004) 11768.
- [35] H.W. Chen, C.D. Medley, K. Sefah, D. Shangguan, Z. Tang, L. Meng, J.E. Smith, W. Tan, *ChemMedChem* 3 (2008) 991.
- [36] R. Polsky, R. Gill, L. Kaganovsky, I. Willner, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 2268.
- [37] R. Langer, O.C. Farokhzad, J. Cheng, B.A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P.W. Kantoff, J.P. Richie, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (2006) 6315.
- [38] A.J. Haes, B.C. Giordano, G.E. Collins, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 3758.
- [39] Y. Li, L. Guo, F. Zhang, Z. Zhang, J. Tang, J. Xie, *Electrophoresis* 29 (2008) 2570.
- [40] M. Song, Y. Zhang, T. Li, Z. Wang, J. Yin, H. Wang, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 873.
- [41] J.C. Cox, A.D. Ellington, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9 (2001) 2525.
- [42] <http://www.sigmaaldrich.com>
- [43] <http://www.vulgaris-medical.com>
- [44] V.A. Proctor, F.E. Cunningham, *Food Sci. Nutr.* 26 (1988) 4.
- [45] F. Wasserfall, M. Teuber, *Applied and Environmental Microbiology* 38 (1979) 197.
- [46] R. Marchal, D. Chaboche, L. Marchal-Delahaut, C. Gerland, J.P. Gandon, P. Jeandet, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000) 3225.
- [47] S. Frémont, G. Kanny, J.P. Nicolas, D.A. Moneret-Vautrin, *Allergy* 52 (1997) 224
- [48] D.T. Tran, K.P.F. Janssen, J. Pollet, E. Lammertyn, J. Anne, A. Van Schepdael, J. Lammertyn, *Molecules* 15 (2010) 1127.
- [49] G.S. Manning, *Biophysical Chemistry* 7 (1977) 95.

# **Chapitre I**

## **Revue bibliographique**

## Introduction

Les acides nucléiques - acide désoxyribonucléique (ADN) et acide ribonucléique (ARN) - constituent le support de l'information génétique et déterminent l'identité biologique d'un organisme. Du point de vue des biotechnologies, ce sont également les seules molécules biologiques reproductibles à l'identique grâce à un mécanisme enzymatique simple, la Réaction en Chaîne par Polymérase, plus connu sous le nom de PCR (pour *polymerase chain reaction*). De ce fait, les acides nucléiques sont particulièrement bien adaptés pour la production en série, et comptent ainsi parmi les macromolécules les plus utilisées en biologie à l'heure actuelle (sondes, amorces d'amplification...) [1]. Cependant, leur application en biotechnologie est essentiellement basée sur l'enchaînement des nucléotides les uns aux autres (la séquence primaire), les interactions recherchées mettant alors en jeu l'appariement canonique (type Watson-Crick) des nucléotides complémentaires situés sur deux molécules d'acide nucléique distinctes. Les acides nucléiques présentent pourtant une richesse structurale remarquable, la conformation de la chaîne oligonucléotidique dans l'espace (les structures secondaire et tertiaire) étant dictée par la séquence primaire. Certaines de ces structures présentent une activité catalytique ou des propriétés de reconnaissance vis-à-vis d'autres classes de molécules (telles que les protéines) par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques, de liaisons hydrogènes ou d'interactions hydrophobes [1]. Le vivant fournit ainsi de nombreux exemples de structures fonctionnelles d'ARN sélectionnées par l'évolution naturelle. Néanmoins, ces molécules ne représentent qu'une infime partie de l'ensemble des séquences possibles : la molécule d'ADN ou d'ARN étant constituée de 4 unités de base, pour un acide nucléique composé de 100 nucléotides, il est théoriquement possible d'engendrer  $4^{100}$  séquences différentes ( $10^{60}$ ). Il paraît donc légitime de supposer que des séquences autres que les séquences naturelles peuvent elles aussi conduire à des structures fonctionnelles [2]. Si l'on dispose d'une population d'oligonucléotides suffisamment riche, on peut donc raisonnablement penser qu'il s'y trouvera une séquence permettant la reconnaissance d'une cible donnée [3]. La coexistence, dans une même entité moléculaire, de la structure et de la séquence permet alors, par alternance d'étapes de sélection (basées sur la structure) et d'amplification (basées sur la séquence), d'isoler l'individu possédant les propriétés attendues [2]. Ce procédé, appelé évolution moléculaire dirigée ou SELEX (pour *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*), est à la base du concept d'aptamère. Ce néologisme,

fondé sur le latin *aptus* (apte, approprié à, ou qui se lie à, qui joint) et le suffixe *mère* (unité de base composant un polymère), signifie littéralement « polymère adapté à une fonction » et désigne une structure d'acide nucléique issue de l'évolution d'une population initiale par sélection, à chaque génération successive, des individus les mieux adaptés à une fonction donnée [1].

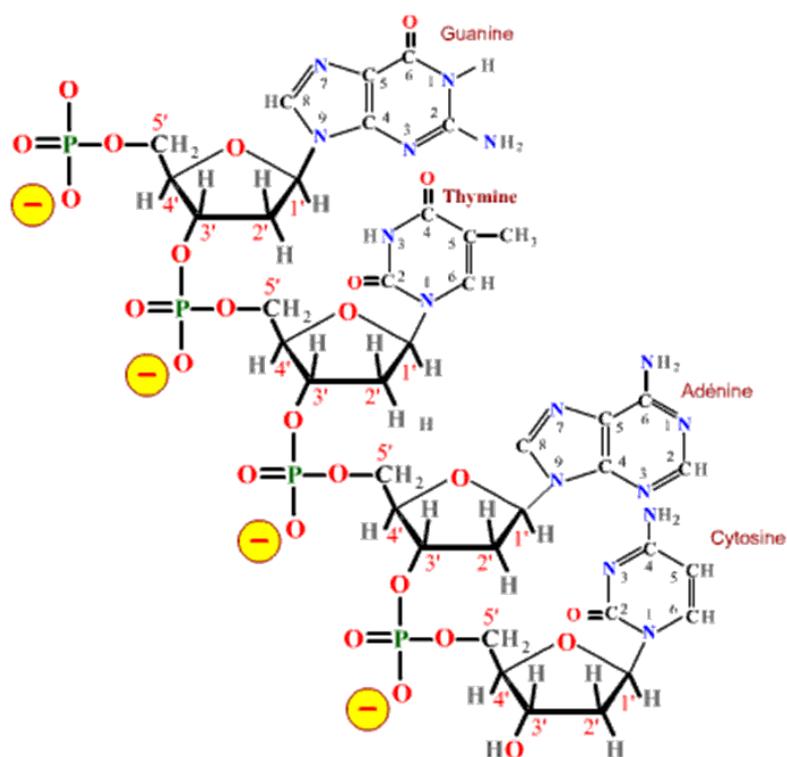
Développés simultanément par plusieurs laboratoires dans les années 1990 [4-8], les aptamères sont de courts oligonucléotides synthétiques (quelques dizaines de bases nucléiques) présentant une affinité et une spécificité remarquables vis-à-vis d'une cible donnée. Possédant des propriétés de reconnaissance moléculaire semblables à celles des anticorps, les aptamères présentent en outre de nombreux avantages par rapport à ces derniers ; en particulier, les aptamères peuvent être sélectionnés contre tout type de cible, indépendamment de la réponse immunitaire engendrée par celle-ci : petites molécules, acides nucléiques, protéines, ainsi que des cibles plus complexes telles que des virus ou des cellules. Les aptamères sont utilisés dans le cadre de nombreuses applications impliquant un phénomène de reconnaissance moléculaire. D'abord essentiellement employés comme agents thérapeutiques ou de diagnostic, ils sont depuis plus récemment utilisés pour diverses applications analytiques : essais bioanalytiques, techniques séparatives ou élaboration de biocapteurs.

Après avoir décrit la structure et les propriétés des aptamères, nous présenterons leurs conditions d'obtention par évolution moléculaire dirigée. La dernière partie de ce chapitre sera consacrée à une revue détaillée des différentes applications impliquant des aptamères.

# I. Structure et propriétés des aptamères

## I. 1. Caractéristiques structurales

Les oligonucléotides sont des oligo-anions. Chaque motif unitaire possède une charge négative à pH neutre (apportée par le groupement phosphate), des sites donneurs ou accepteurs de liaison hydrogène et un hétérocycle aromatique (base nucléique) pouvant générer des interactions d'empilement (Figure 1). La formation de paires de bases entraîne le repliement des oligonucléotides, générant ainsi un arrangement tridimensionnel (structures secondaire et tertiaire) susceptible d'interagir avec la cible (via des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogène...). La sélection revient donc à identifier dans la banque initiale la forme la mieux adaptée à la cible, c'est-à-dire celle permettant le plus grand nombre d'interactions et donc la formation du complexe le plus stable.



**Figure 1 : Structure d'un oligonucléotide en série ADN.** En rouge : sites donneurs de liaison hydrogène ; en bleu : sites accepteurs de liaison hydrogène.

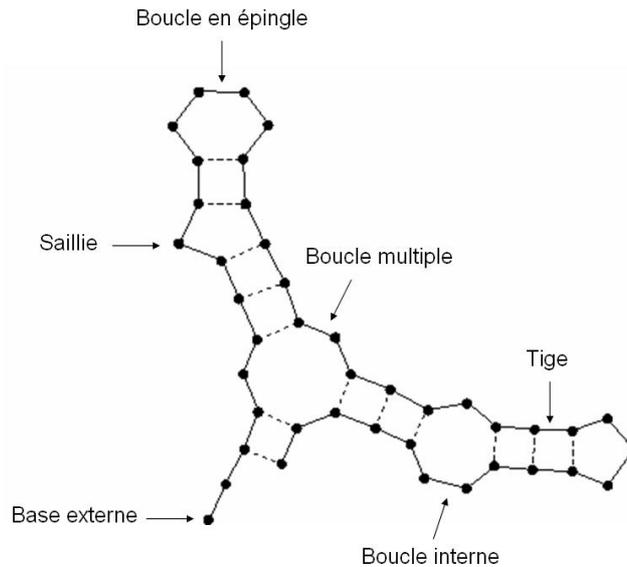
## I. 1. 1. De la structure secondaire à l'arrangement suprahélicoïdal

Le repliement des acides nucléiques monobrin entraîne la formation de doubles hélices (ou tiges) de longueur variable via l'appariement de régions complémentaires au sens de Watson-Crick [9] : c'est ce qu'on appelle la structure secondaire. L'interaction par liaison hydrogène entre les groupements 2'-hydroxyle des riboses (*ribose zipper*) stabilise le rapprochement électrostatiquement défavorable des hélices, faisant alors émerger une architecture tridimensionnelle compacte : c'est ce qu'on appelle la structure tertiaire, ou organisation suprahélicoïdale de l'oligonucléotide. De nombreuses interactions stabilisatrices mettent en jeu des molécules d'eau ainsi que divers cations, occupant des sites de coordination spécifiques définis par l'arrangement tridimensionnel local de l'oligonucléotide.

Les petits et grands sillons des hélices sont des zones d'interaction favorables, mais peu spécifiques du fait de l'inaccessibilité des groupements fonctionnels des bases, tournés vers l'intérieur. Seules des déformations locales de l'hélice, en exposant certains de ces groupements, permettent des interactions spécifiques avec la cible. Ces déformations proviennent de l'appariement non canonique de bases (appelé « *wooble pairing* » [10]) ou de l'association de deux bases consécutives d'un même brin pour former une plate-forme d'interaction.

## I. 1. 2. Eléments structuraux de base

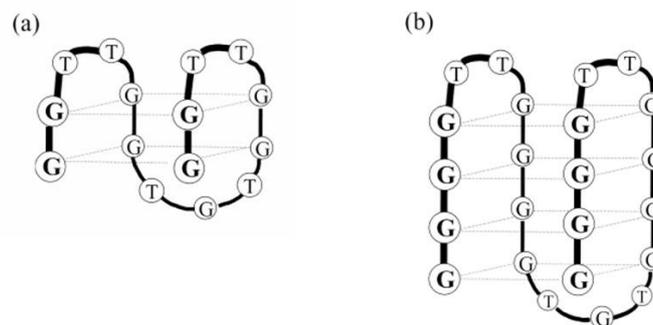
Les régions de bases non appariées donnent naissance à différents types de conformations : saillies, jonctions, boucles (Figure 2), pseudo-nœuds et quadruplexes (Figure 3) [11]. La présence d'une ou plusieurs bases non appariées au sein d'une hélice crée une saillie, orientée soit vers l'intérieur et stabilisée par « *stacking* », soit vers l'extérieur en fournissant ainsi un site d'interaction privilégié. La zone de connexion entre deux hélices d'orientations différentes est appelée jonction (*turn*). Différentes familles (C-turn, U-turn) ont été identifiées selon le nucléotide autour duquel s'effectue le changement d'orientation du brin. Le repliement d'un brin sur lui-même afin de former une double hélice donne lieu à une structure en épingle à cheveu, ou « *tige-boucle* ». Des structures très compactes de type « *pseudo-nœud* » peuvent également se former par interaction complémentaire entre une tige-boucle et une portion simple brin. Elles sont plus fréquemment rencontrées dans les aptamères ARN [12]. L'empilement d'hélices et le compactage de l'ensemble sont la conséquence d'interactions entre boucles.



**Figure 2 : Eléments structuraux de base des acides nucléiques (d'après [13])**

Les séquences riches en guanine (G) peuvent également présenter des structures à quatre brins appelées quadruplexes. Un quadruplexe est constitué d'une ou plusieurs tétrades de G (G-quartet) successives, chacune étant formée par quatre guanines associées dans un plan grâce à des liaisons hydrogènes, via des appariements de type Hoogsteen [14] (Figure 3). Cette structure peut être stabilisée en présence de divers cations coordonnés entre les plans de deux tétrades de G voisines. Les tétrades de G sont plus fréquemment rencontrées dans les aptamères ADN [12].

Il est vraisemblable que l'un des rôles de ces motifs structuraux est de constituer une ossature permettant de présenter les nucléotides localisés dans les boucles dans des conformations favorables à l'interaction avec la cible.



**Figure 3 : Structures quadruplexes constituées de 2 (a) et 4 (b) tétrades de G [15]**

### **I. 1. 3. Aptamères ADN ou ARN**

Les chaînes d'ADN et d'ARN repliées ont des paramètres conformationnels différents. En effet, les doubles hélices d'ADN et d'ARN n'ont pas le même nombre de résidus par tour, ni la même distance interphosphate. La géométrie de sillon est également différente. Pour une même séquence primaire, les structures secondaire et tertiaire obtenues seront donc différentes selon la nature des nucléotides. Changer de chimie pour une séquence donnée revient ainsi à changer la conformation de l'aptamère et donc ses propriétés d'interaction. Par conséquent, la séquence synthétisée en ARN d'un aptamère ADN conduit le plus souvent à un ligand sans affinité pour la cible, et vice versa.

Des aptamères ARN et ADN ayant des caractéristiques comparables peuvent néanmoins être sélectionnés contre une même cible. Par exemple, pour la transcriptase inverse (RT) du VIH-1, les deux types d'aptamères ont des constantes de dissociation identiques et des propriétés inhibitrices similaires [16,17]. En outre, les deux composés sont inhibiteurs compétitifs l'un de l'autre, ce qui laisse à supposer que les sites d'interaction sont identiques. Pourtant, les séquences primaires et les structures secondaires prédites pour ces deux aptamères sont totalement différentes.

### **I. 1. 4. Structure du complexe aptamère – cible**

La liaison entre un aptamère et sa cible peut être considérée comme un phénomène dynamique impliquant un réarrangement plus ou moins important d'une structure préexistante, voire l'adoption d'une nouvelle structure intégrant la cible [18]. Une étude par résonance magnétique nucléaire (RMN) de l'aptamère dirigé contre l'arginine a révélé une structure en épingle à cheveux renfermant deux boucles internes asymétriques. Cette structure est relâchée à l'état libre mais se stabilise lorsque l'arginine est liée [19].

La liaison avec une petite molécule aromatique s'avère ainsi beaucoup plus élaborée qu'une simple intercalation au sein d'un acide nucléique double brin. L'interaction entre un aptamère ARN et la théophylline (une purine modifiée) implique une liaison hydrogène entre une cytosine non appariée et l'hydrogène en N7 de la cible. Le remplacement de cet hydrogène par un groupement méthyle conduit à une molécule analogue, la caféine, qui ne peut donc pas interagir avec l'aptamère (Figure 4). Bien que structurellement différents, les aptamères ADN et ARN dirigés contre l'adénosine monophosphate (AMP) possèdent le même mode de reconnaissance de leur cible : celle-ci est appariée de manière spécifique à une

guanine (G), en interaction avec une paire non canonique G-G. De même, des aptamères ADN et ARN reconnaissent tous deux l'arginine grâce à la liaison d'une base au groupement guanidium positif. Dans le cas de protéines liant l'ADN cellulaire, l'interaction met souvent en jeu les groupements phosphate de l'aptamère, qui reproduit la structure locale de l'ADN naturellement reconnu [20]. Les sillons de la double hélice fournissent également des sites de reconnaissance adéquats. Les structures de complexes aptamère-cible élucidées par diffraction des rayons X ou résonance magnétique nucléaire (RMN) montrent l'inclusion importante de la molécule-cible au sein de l'architecture oligonucléotidique, celle-ci devenant alors un élément intrinsèque de la structure globale du complexe [21,22].

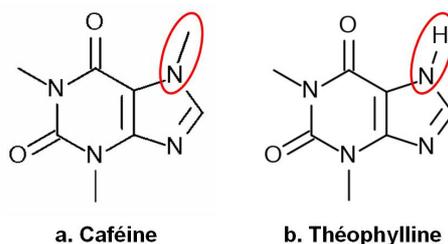


Figure 4 : Structure de la caféine (a) et de la théophylline (b)

## ***I. 2. Propriétés générales des aptamères***

### **I. 2. 1. Avantages par rapport aux anticorps**

Les aptamères possèdent des propriétés de reconnaissance moléculaire semblables aux anticorps, mais présentent également de nombreux avantages par rapport à ces derniers (Tableau 1). Tout d'abord, les aptamères sont identifiés grâce à un processus de sélection *in vitro*, qui ne nécessite pas l'utilisation d'animaux ni de cellules. De ce fait, ils peuvent être générés contre des toxines ou des molécules n'engendrant pas de réponse immunitaire. De plus, les aptamères sont produits par synthèse chimique et purifiés sous conditions dénaturantes, ce qui permet d'obtenir une reproductibilité et un degré de pureté beaucoup plus élevés que pour les anticorps. Le greffage de marqueurs tels que la fluorescéine ou la biotine est effectué à des positions précises et bien identifiées. Des groupements fonctionnels peuvent également être introduits pendant la synthèse afin de permettre une dérivatisation ultérieure. Les aptamères présentent en outre une meilleure stabilité temporelle que les anticorps, et peuvent être transportés à température ambiante. Après dénaturation, ils peuvent être régénérés facilement et en seulement quelques minutes. Enfin, les aptamères reconnaissent

une gamme plus large de molécules-cibles (incluant les protéines, les peptides et les acides aminés, les acides nucléiques, les molécules organiques et même les ions métalliques, cf. Tableau 3) avec une affinité et une spécificité plus élevées que les anticorps.

**Tableau 1 : Comparaison des anticorps et des aptamères [23-25]**

Paramètre	Anticorps	Aptamères
<b>Production</b>	Production in vivo (animaux ou lignées cellulaires) <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Long, coûteux</li> <li>▪ Purification difficile</li> <li>▪ Cibles immunogènes</li> <li>▪ Variation de l'affinité d'un lot à l'autre</li> </ul>	Sélection in vitro puis production par synthèse chimique <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rapide, faible coût</li> <li>▪ Pureté élevée (conditions dénaturantes)</li> <li>▪ Tout type de cibles</li> <li>▪ Reproductibilité d'un lot à l'autre</li> </ul>
<b>Stabilité</b>	Sensibilité à la température (dénaturation irréversible)	Stabilité à long terme : transport à température ambiante, régénération facile et rapide
<b>Modifications chimiques</b>	Diminution ou perte d'affinité possible lors du marquage	Conservation de l'affinité (contrôle de la position de la modification)
<b>Paramètres cinétiques</b>	Non modifiables	Modifiables en fonction du procédé SELEX employé

## I. 2. 2. Affinité et spécificité

La plupart du temps, la sélection in vitro permet l'obtention d'aptamères présentant une affinité très élevée pour leur cible. Les protéines constituent les cibles les plus adaptées à la sélection d'aptamères, la constante de dissociation ( $K_d$ ) du complexe aptamère-protéine se trouvant généralement dans une gamme allant du nanomolaire au sub-nanomolaire ( $10^{-9}$  à  $10^{-11}$  M). Pour des cibles de poids moléculaire plus faible (colorants, antibiotiques...), le  $K_d$  est plutôt de l'ordre du micromolaire ( $10^{-6}$  à  $10^{-7}$  M) [26]. Cette affinité plus faible peut s'expliquer par deux raisons : tout d'abord, la surface de contact avec l'aptamère est plus faible, ce qui réduit le nombre de groupes fonctionnels disponibles pour l'interaction [18] ; en outre, la plupart des petites molécules ont une structure moins rigide que les protéines, ce qui implique un coût énergétique supplémentaire pour fixer la conformation lors de l'interaction avec l'aptamère [27]. Dans le cas d'aptamères sélectionnés contre des protéines se fixant naturellement sur les acides nucléiques, les séquences isolées par sélection possèdent parfois pour leur cible une affinité plus forte que la séquence naturelle. C'est le cas par exemple des

aptamères dirigés contre la protéine Rev (transactivateur nucléaire nécessaire à la réplication virale et à l'expression des protéines de structure du virus VIH-1), qui présentent un  $K_d$  jusqu'à 10 fois inférieur à celui de l'ARN RRE (*Rev responsive element*), site de fixation naturel de la protéine Rev [28]. Cela peut s'expliquer par le fait que la sélection *in vitro* est basée sur le seul critère d'affinité, alors que la fonction biologique assurée par les couples protéines-acides nucléiques issus de l'évolution naturelle implique de nombreux paramètres (réversibilité des complexes, réaction croisée avec d'autres partenaires) qui peuvent être incompatibles avec une constante d'association trop élevée [2].

Outre leur affinité élevée, les aptamères présentent également une spécificité remarquable vis-à-vis de leur cible. Ainsi, un aptamère sélectionné contre la transcriptase inverse (RT) du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) [16] n'interagit pas avec les enzymes homologues du virus du myéloblastome aviaire (AMV) ou du virus de la leucémie murine (MMLV). A l'inverse, les aptamères sélectionnés contre les RT d'AMV ou de MMLV ne reconnaissent pas l'enzyme du rétrovirus humain [29]. Ces ligands sont donc hautement spécifiques, alors qu'ils interagissent avec le site actif de l'enzyme, supposé être très similaire pour les différentes RT. De même, comme il a été indiqué précédemment, un aptamère sélectionné contre un dérivé purique, la théophylline, présente une affinité  $10^4$  fois plus faible pour la caféine, qui ne diffère de la théophylline que par un groupement méthyle sur la position N7 (Figure 4) [30]. Dans ce cas, l'enrichissement de la population en candidats spécifiques pour la théophylline a été amélioré par l'ajout d'une étape de contre-sélection : les ARN retenus sur une colonne de théophylline ont été d'abord soumis à élution par une solution de caféine de façon à éliminer les séquences ne pouvant discriminer entre les deux dérivés puriques.

La spécificité des aptamères et leur affinité semblent étroitement liées : l'obtention d'un ligand présentant une affinité suffisamment élevée garantit sa spécificité vis-à-vis de la cible [18]. En effet, les ligands présentant l'affinité la plus élevée sont ceux possédant la plus grande surface de contact avec la cible, donc la plus grande complémentarité de forme. Par conséquent, même une modification minimale de la surface de la cible peut entraîner une diminution significative de l'interaction avec l'aptamère.

## II. Obtention des aptamères : la méthode SELEX ou évolution moléculaire dirigée

Le procédé SELEX, développé simultanément par deux équipes en 1990 [4,5], repose sur une approche combinatoire : le composé présentant les propriétés désirées est recherché au sein d'une banque (population produite de façon aléatoire) grâce à un processus de criblage. La performance de cette méthode est donc basée sur la constitution de banques d'oligonucléotides présentant une diversité moléculaire suffisante, ainsi que sur l'efficacité des techniques de tri mises en œuvre. Le nombre de molécules répondant à un critère de tri donné étant en général très faible, il est nécessaire d'amplifier les candidats retenus. Contrairement aux autres composés, les oligonucléotides ont l'avantage de posséder l'information nécessaire à leur copie, ce qui permet de les amplifier par la méthode classique de PCR.

### II.1. Principe général

Le principe du procédé SELEX est représenté schématiquement sur la Figure 5. Une banque d'oligonucléotides (ADN simple brin ou ARN) est obtenue par synthèse automatisée. Les séquences sont constituées d'une région aléatoire de  $n$  nucléotides (en général de 20 à 100) encadrée par deux séquences constantes (environ 20 bases) jouant le rôle de promoteur lors de l'étape d'amplification par PCR. La diversité moléculaire est généralement de l'ordre de  $10^{13}$  à  $10^{15}$  séquences différentes.

Cette population est ensuite soumise à une pression de sélection, qui peut être l'existence d'une activité catalytique (ce cas ne sera pas discuté ici), ou, plus souvent, l'affinité pour une cible choisie. Les candidats répondant au critère de tri sont alors isolés des autres par une méthode de séparation adaptée.

Les séquences sélectionnées sont enfin amplifiées par PCR grâce à des amorces qui s'hybrident aux régions fixes présentes chez tous les membres de la population. Une banque enrichie en candidats potentiels est donc obtenue, à partir de laquelle un nouveau cycle de sélection/amplification peut être effectué. Le taux d'enrichissement dépend des conditions de sélection, qui jouent un rôle déterminant pour l'évolution de la population.

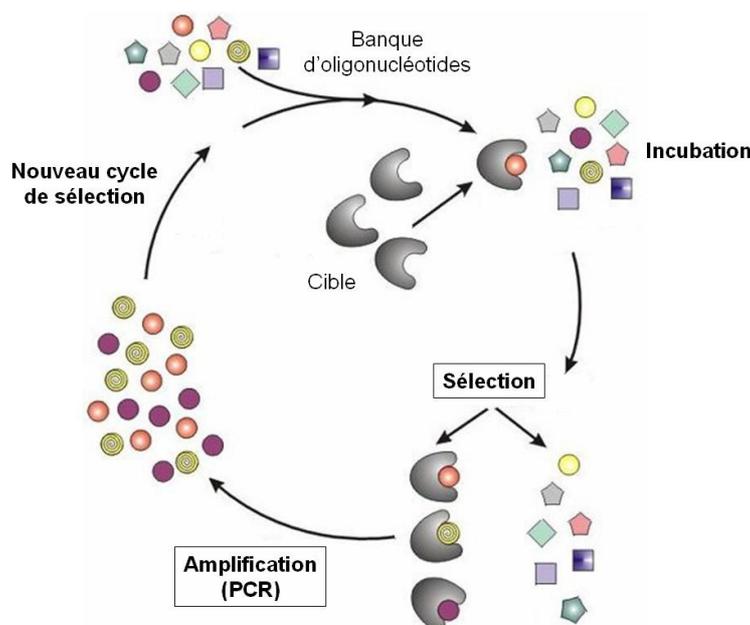


Figure 5 : principe du procédé SELEX (d'après [31])

Cette succession d'étapes de sélection et d'amplification est réitérée (environ 10-15 cycles), permettant ainsi l'enrichissement progressif de la population en séquences présentant les meilleures qualités pour la fonction recherchée. Parallèlement, la diversité de la population se réduit, jusqu'à ne plus comporter que quelques séquences d'aptamères. Les techniques classiques du génie génétique (clonage, séquençage, expression) permettent alors d'identifier ces aptamères puis de les produire ensuite en grande quantité, après une éventuelle troncation des régions fixes. L'analyse comparative des séquences obtenues permet de mettre en évidence la covariation et la conservation de certaines bases, et d'en déduire des motifs structuraux critiques pour la propriété recherchée.

Dans ce protocole, les deux étapes essentielles sont la conception de la banque d'oligonucléotides et l'efficacité de la méthode de sélection [2].

## II. 2. Création d'une banque d'oligonucléotides

### II. 2. 1. Nature chimique des acides nucléiques

Il est d'abord nécessaire de s'interroger sur le type d'acide nucléique (ADN ou ARN) qui sera utilisé pour créer la banque. Si l'on dispose d'une séquence initiale présentant des caractéristiques proches de celles recherchées, il est préférable d'utiliser une banque de même nature chimique [2]. A l'inverse, si l'on cherche à isoler un aptamère pour lequel il n'existe

aucun équivalent naturel, le choix peut être guidé par l'utilisation visée. Si la sélection utilise de l'ARN, le procédé SELEX nécessite des étapes supplémentaires de conversion ARN-ADN puis ADN-ARN, par transcription inverse et transcription, respectivement [3]. Le protocole de sélection ADN est donc plus simple à mettre en œuvre. L'ADN possède une meilleure stabilité temporelle que l'ARN, celui-ci étant plus sensible à la dégradation par les nucléases [32]. Les banques d'ADN sont donc particulièrement adaptées pour des applications nécessitant une stabilité accrue de l'aptamère (biocapteurs, suivi environnemental, thérapie). Néanmoins, les banques d'ARN conduisent généralement à des aptamères présentant des affinités plus élevées du fait de la capacité de l'ARN à adopter une plus large variété de conformations que l'ADN [31,33].

## II. 2. 2. Diversité moléculaire

Le choix de la taille de la région variable et de son niveau de dégénérescence détermine la diversité moléculaire de la banque [3]. Si la portion aléatoire comporte  $n$  nucléotides, la diversité théorique est égale à  $4^n$  puisque chaque position peut être occupée de façon équiprobable par l'un des quatre nucléotides A, T, G ou C. Ainsi, pour  $n = 50$ , la diversité théorique est de  $4^{50}$  soit  $10^{30}$ , une valeur inaccessible en pratique puisqu'elle correspond à une masse de plus de  $10^5$  tonnes si chaque séquence est représentée une fois. Pour des raisons expérimentales (synthèse, volume des échantillons à prélever), la limite de complexité analysable se situe donc aux alentours de  $10^{15}$  molécules, ce qui correspond à une banque de séquences possédant 25 positions aléatoires dans laquelle tous les candidats sont représentés [3]. S'il y a davantage de positions aléatoires, la banque ne contiendra pas un exemplaire de chaque molécule possible. Ainsi, si la région variable est constituée de 30 nucléotides (ce qui correspond à une diversité théorique de  $10^{18}$  environ), seul 1/1000 des séquences possibles seront représentées. En pratique, cela est généralement suffisant pour obtenir des aptamères possédant les propriétés désirées, d'autant plus que les polymérases bactériennes utilisées lors de l'étape d'amplification engendrent naturellement un assez fort taux de mutations (environ 0,01%, soit une mutation tous les  $10^4$  nucléotides incorporés) [1,3]. Loin de constituer un inconvénient, cela introduit une variabilité supplémentaire qui permet d'augmenter la diversité de la population d'origine tout au long du processus SELEX : pour une banque avec une région aléatoire de 100 nucléotides, un candidat sur 100 sera modifié à chaque cycle d'amplification, conduisant donc à l'apparition de  $10^{13}$  nouveaux candidats.

### ***II. 3. Choix et optimisation de la méthode de sélection***

La sélection s'opère à chaque cycle, par séparation physique entre les oligonucléotides associés à la molécule-cible et les oligonucléotides libres. Diverses techniques peuvent être mises en œuvre : filtration sur membrane, chromatographie d'affinité (capture sur phase stationnaire fonctionnalisée avec la molécule-cible), centrifugation, électrophorèse sur gel, cytométrie de flux et plus récemment électrophorèse capillaire [34]. L'efficacité de la sélection dépend fortement des paramètres expérimentaux (concentration relative des candidats et de la cible, force ionique, température, temps d'incubation, conditions de lavage, pH...) qui peuvent donc être ajustés de façon à moduler la pression de sélection. La notion de stringence fait référence à l'ensemble de ces conditions, par analogie avec le terme employé lors du processus d'appariement d'oligonucléotides simple brin : à haute stringence, les duplex se forment uniquement entre des brins parfaitement complémentaires, tandis qu'une plus faible stringence autorise un certain degré de mésappariement. La stringence est généralement augmentée au cours des cycles successifs de façon à favoriser la capture des oligonucléotides les plus affins. Dans le cas de la rétention sur filtre ou phase stationnaire fonctionnalisée, les oligonucléotides fixés sur la cible sont ensuite élués. Une contamination de la population d'aptamères par des séquences associées de façon non spécifique au support (filtre, colonne, bille...) peut alors survenir. Afin d'éviter l'amplification de candidats ne possédant pas les propriétés souhaitées, une étape de contre-sélection peut donc être mise en œuvre au cours du cycle SELEX : passage préliminaire sur une colonne chromatographique sans cible, élution spécifique par la cible libre ou un ligand spécifique de la cible ou alternance de différentes méthodes de sélection.

### ***II. 4. Modifications chimiques***

Les acides nucléiques, en particulier l'ARN, sont sensibles à la dégradation par les nucléases, ce qui constitue l'un des obstacles majeurs à l'utilisation des aptamères dans un environnement biologique (milieu de culture cellulaire ou *in vivo*). Afin d'éviter le clivage enzymatique par les nucléases, deux stratégies peuvent être envisagées : utilisation d'analogues modifiés ou élaboration d'aptamères énantiomères appelés *spiegelmers*.

## II. 4. 1. Utilisation d'analogues modifiés

Certaines modifications de la base azotée, du ribose ou du groupement phosphate des nucléotides permettent d'obtenir des acides nucléiques résistants aux nucléases [35]. Ces modifications peuvent être introduites avant ou après la mise en œuvre du procédé SELEX.

La modification post-SELEX est un processus lent et fastidieux. En effet, les nucléotides modifiés induisent des variations stériques et électroniques par rapport au motif naturel, ce qui peut entraîner un changement de structure de l'aptamère et donc une diminution, voire une perte des propriétés pour lesquelles il a été sélectionné. Les conséquences de ces modifications chimiques étant difficilement prédictibles, il est donc nécessaire d'identifier les positions auxquelles les modifications seront tolérées.

Il est donc plus aisé d'opérer la sélection directement sur les oligonucléotides comportant initialement la modification souhaitée (modification pré-SELEX). Cela implique néanmoins que les analogues soient compatibles avec les polymérases utilisées lors des étapes d'amplification par PCR, ce qui restreint considérablement le choix. Les modifications chimiques possibles consistent ainsi à remplacer le groupement hydroxyle en 2' du ribose par un groupement O-méthylé, aminé ou fluoro-pyrimidine. Afin que les précurseurs modifiés obtenus soient correctement incorporés lors de la PCR, l'utilisation de polymérases mutantes est nécessaire. Une alternative consiste à modifier le squelette phosphaté des acides nucléiques [36]. Les nucléotides phosphorothioates [37] et boranophosphates [38], où un oxygène non pontant du groupement phosphodiester est substitué respectivement par un soufre ou un groupement borane, sont les seuls compatibles avec les enzymes nécessaires au SELEX. Les modifications des bases restent rares, même si une sélection employant des 5-(1-pentynyl)-2'-deoxyuridines a été réalisée avec succès [39].

D'autres modifications peuvent également être introduites pour apporter de nouvelles fonctionnalités aux aptamères sélectionnés (hydrophobie, photoréactivité...).

## II. 4. 2. Elaboration d'aptamères énantiomères (spiegelmers)

Une autre approche pour l'obtention d'aptamères résistants aux nucléases exploite la chiralité des acides nucléiques. En effet, les nucléases sont spécifiques des riboses et désoxyriboses de série D qui constituent les acides nucléiques naturels. Les isomères L ne sont donc pas sensibles aux nucléases, mais ils ne peuvent être produits par les polymérases. Si un aptamère naturel (D) est sélectionné contre l'énantiomère de la cible visée, alors

l'énantiomère de cet aptamère (L) reconnaîtra la cible naturelle, et sera en outre résistant aux nucléases. Cette stratégie d'élaboration d'aptamères énantiomères, également appelés *spiegelmers* (de « Spiegel », miroir en allemand), a été utilisée avec succès pour des cibles telles que des nucléosides (D-adénoside), des acides aminés (L-arginine) et des peptides (vasopressine). Elle est également valorisée par la société allemande Noxxon Pharma AG® pour l'élaboration de substances thérapeutiques dirigées contre des peptides, comme par exemple la gonadolibérine ou GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*), une neurohormone identifiée comme cible thérapeutique pour certains cancers hormono-dépendants ainsi que pour des techniques de fécondation assistée [40].

## II. 5. Modifications du procédé SELEX

De nombreuses variantes du procédé SELEX conventionnel ont été proposées (Tableau 2), visant à un accroissement de l'efficacité et de la rapidité de la sélection de même qu'à un meilleur contrôle des propriétés des aptamères obtenus.

Tableau 2 : Principe, avantages et limitations du procédé SELEX et de quelques variantes

Variante	Principe	Avantages	Limitations
<b>SELEX conventionnel</b>	<i>Sélection par chromatographie d'affinité ou filtration</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Simple</li> <li>▪ Peu coûteux</li> <li>▪ Applicable à tous types de cible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Interactions non spécifiques</li> <li>▪ Biais cinétique</li> </ul>
<b>CE-SELEX</b>	<i>Sélection par CE</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Réduction du nombre de cycles</li> <li>▪ Sélection en milieu libre</li> <li>▪ Détermination et contrôle des paramètres d'interaction</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Taille de la cible</li> </ul>
<b>Non-SELEX</b>	<i>Sélection par CE sans amplification entre les cycles</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Simple, rapide</li> <li>▪ Automatisation possible</li> </ul>	
<b>Tailored-SELEX</b>	<i>Réduction de la taille des régions fixes</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Diminution de la taille des aptamères</li> <li>▪ Pas d'étape de troncation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Deux étapes supplémentaires : ajout et suppression de promoteurs pour l'amplification</li> </ul>
<b>Toggle-SELEX</b>	<i>Alternance de cycles de sélection mettant en œuvre des cibles analogues</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Réactivité croisée</li> <li>▪ Evaluation pré-clinique d'aptamères potentiellement thérapeutiques (modèles animaux)</li> </ul>	

Variante	Principe	Avantages	Limitations
<b>Expression cassette SELEX</b>	<i>Optimisation de l'insertion de l'aptamère dans une cassette d'expression</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Expression intracellulaire de l'aptamère</li> </ul>	
<b>SELEX génomique</b>	<i>Banque initiale dérivée du génome de l'organisme d'intérêt</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Identification de séquences naturelles reconnaissant la cible</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Les séquences promotrices doivent être retirées avant l'étape de sélection afin d'éviter leur hybridation avec les fragments génomiques</li> </ul>
<b>Photo-SELEX</b>	<i>Sélection via la formation d'une liaison photoinduite</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Affinité et spécificité accrues</li> <li>▪ Application au développement de systèmes miniaturisés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Présence de sites réactifs sur la cible : non applicable aux petites molécules</li> </ul>
<b>AFM-SELEX</b>	<i>Sélection par microscopie à force atomique (AFM)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Obtention d'aptamères de haute affinité</li> <li>▪ Réduction du nombre de cycles</li> </ul>	
<b>SELEX automatisé</b>	<i>Automatisation des différentes étapes</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Gain de temps</li> <li>▪ Optimisation des conditions de sélection</li> <li>▪ Criblages à haut débit</li> <li>▪ Miniaturisation possible</li> </ul>	

## II. 5. 1. Utilisation de l'électrophorèse capillaire

Dans le procédé SELEX conventionnel, la molécule-cible est généralement greffée sur un support stationnaire par l'intermédiaire d'un espaceur, ce qui peut gêner l'interaction des oligonucléotides avec la cible (des sites potentiels d'interaction pouvant être masqués par l'espaceur) et conduire à des interactions non spécifiques des oligonucléotides avec le support. D'autre part, les séquences les plus fortement liées à la cible sont également les plus difficiles à éluer, ce qui introduit un biais cinétique défavorable aux candidats les plus affins. Les techniques de filtration permettent de réaliser la sélection en milieu libre, l'interaction n'étant alors plus perturbée par l'espaceur. Cependant, du fait de la faible efficacité de ces techniques, il est nécessaire d'effectuer un grand nombre de cycles de sélection pour obtenir des aptamères présentant une affinité suffisante. Dans ce contexte, l'électrophorèse capillaire est apparue depuis quelques années comme un outil judicieux pour le procédé SELEX.

### II. 5. 1. 1. CE-SELEX

L'électrophorèse capillaire est récemment apparue comme un outil performant pour la séparation des espèces libres et complexées d'un système substrat-ligand, basée sur la variation de mobilité du substrat ou du ligand induite par la complexation avec l'autre partenaire. En 2004, un procédé baptisé CE-SELEX a ainsi été développé [41] (Figure 6): une banque d'oligonucléotides ADN ou ARN est incubée en milieu libre avec la cible, puis un petit volume est injecté dans le capillaire. La liaison avec la cible s'accompagne d'un changement du rapport charge/masse et d'un réarrangement structural, entraînant ainsi une variation importante de la mobilité électrophorétique des oligonucléotides complexés qui peuvent alors être aisément séparés des séquences libres. Les séquences liées sont collectées, amplifiées puis utilisées pour réaliser un nouveau cycle de sélection.

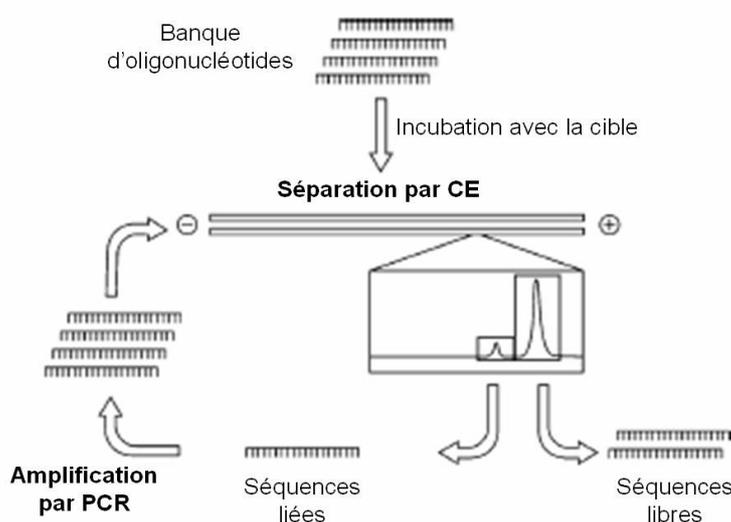
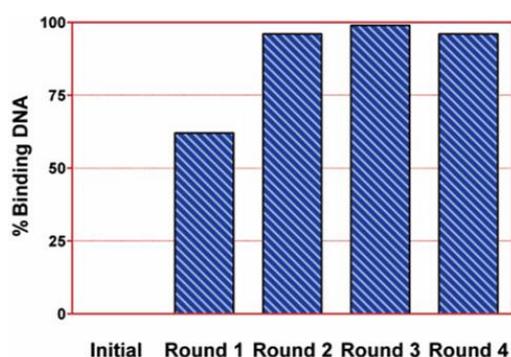


Figure 6 : Représentation schématique du procédé CE-SELEX [42]

Le procédé CE-SELEX présente de nombreux avantages par rapport aux techniques de sélection conventionnelles permettant d'améliorer significativement la rapidité et l'efficacité de l'étape de sélection. Le pouvoir de séparation élevé de l'électrophorèse capillaire permet ainsi d'obtenir des aptamères présentant une affinité et une spécificité élevées pour la cible après 2 à 4 cycles de sélection seulement, au lieu des 8 à 12 cycles nécessaires habituellement [41,42]. De plus, la sélection en milieu libre réduit les interactions non spécifiques et améliore l'accessibilité de la cible. L'absence de support permet en outre de s'affranchir de l'étape de lavage, qui introduit un biais cinétique défavorisant les candidats les plus affins, ainsi que de l'étape de contre-sélection, qui peut entraîner l'élimination de séquences se liant faiblement au support mais fortement à la cible [41]. Enfin, cette méthode permet une détermination

précise des paramètres d'interaction (constante de dissociation  $K_d$ , vitesse de formation  $k_{on}$  et de dissociation  $k_{off}$ ).

Des aptamères dirigés contre différentes cibles ont été sélectionnés par CE-SELEX, avec des  $K_d$  de l'ordre du nM au pM. Le procédé a été démontré avec la sélection d'aptamères dirigés contre un IgE humain [41,42]. Une banque d'oligonucléotides ADN incubée avec l'IgE est injectée et détectée en UV à 254 nm (longueur d'onde caractéristique des acides nucléiques). Afin d'empêcher l'adsorption des protéines, la paroi du capillaire est modifiée par l'alcool polyvinylique (PVA). Les oligonucléotides libres, chargés négativement, migrent rapidement à travers le capillaire. Les molécules d'IgE étant de taille plus importante et de charge quasi-nulle (électrolyte de séparation à pH 8,0, proche du point isoélectrique de l'IgE), les oligonucléotides liés migrent plus lentement. La fraction liée est collectée et amplifiée par PCR, technique impliquant une étape de dénaturation thermique ; ceci entraîne une perte de la structure secondaire des séquences liées, qui se dissocient ainsi de la cible. Les séquences amplifiées sont ensuite soumises à un nouveau cycle de sélection. Afin de suivre la progression de la sélection, la proportion de séquences actives présentes à l'issue de chaque cycle est déterminée par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE). Après seulement 2 cycles de sélection, la quasi-totalité des séquences se lie à l'IgE (Figure 7).

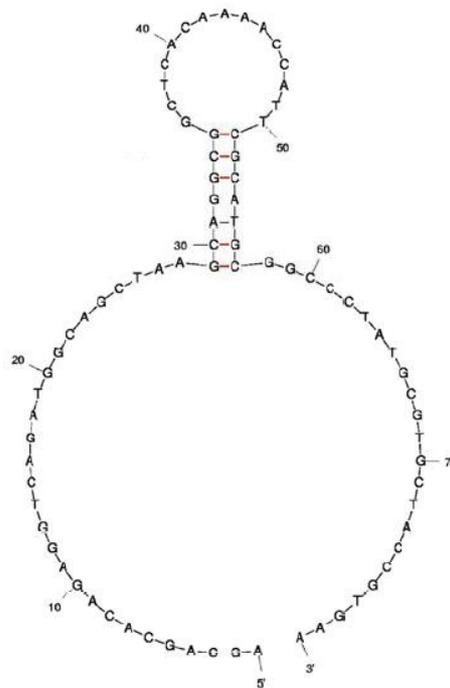


**Figure 7 : Pourcentage de séquences actives [41] des fractions obtenues après chaque cycle de sélection CE-SELEX contre l'IgE**

Ce taux d'enrichissement élevé permet d'obtenir des aptamères présentant une affinité et une spécificité élevées après seulement 4 cycles de sélection. Le  $K_d$  moyen après 4 cycles de sélection est de 29 nM [42], une valeur plus élevée que celle obtenue par SELEX conventionnel ( $K_d$  de 6 nM après 15 cycles de sélection [43]). Cette méthode offre cependant un gain de temps considérable : un cycle de CE-SELEX pouvant être effectué en une journée, les aptamères sont obtenus en 2 à 4 jours, au lieu de plusieurs semaines pour le procédé

conventionnel (séparation par filtration ou par chromatographie d'affinité). De la même façon, des aptamères anti-ricine d'affinité similaire ont été isolés en 4 cycles de sélection par CE-SELEX, contre 9 cycles par SELEX conventionnel (séparation par chromatographie d'affinité) [44].

Plus récemment, un aptamère dirigé contre le lysozyme issu du blanc d'œuf de poule a été sélectionné par CE-SELEX à partir d'une banque d'oligonucléotides ADN composés d'une séquence promotrice de 20 nucléotides et d'une séquence aléatoire de 40 nucléotides (Figure 8) [45]. Après 5 cycles de sélection, une constante de dissociation de  $2,8 \pm 0,3$  nM,  $6,1 \pm 0,5$  nM, et  $52,9 \pm 9,1$  nM a été déterminée par anisotropie de fluorescence, résonance plasmonique de surface (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) et électrophorèse capillaire d'affinité (*Affinity Capillary Electrophoresis*, ACE), respectivement.



**Figure 8 :** structure secondaire de l'aptamère anti-lysozyme sélectionné par CE-SELEX, prédite par le logiciel *mfold* [45]

Une limitation éventuelle de la technique CE-SELEX est la taille de la cible, qui doit être suffisante afin d'induire une variation de mobilité de l'ADN lors de la complexation. Néanmoins, une sélection contre le neuropeptide Y (NPY) a montré que la CE-SELEX pouvait être appliquée avec succès à la sélection d'aptamères dirigés contre des cibles de petite taille [46]. Le NPY est un peptide situé dans le système nerveux central et périphérique composé de 36 acides aminés ( $M = 4272$  g/mol), de taille bien inférieure à celle des oligonucléotides 80-mer ( $\sim 25$  kDa) utilisés pour la sélection. En outre, tout comme l'ADN, le

NPY est chargé négativement à pH neutre ( $pI = 5,52$ ). En capillaire non modifié, le complexe NPY-ADN a une mobilité apparente plus élevée que l'ADN libre ; les séquences actives sont donc collectées avant le pic correspondant à l'ADN libre. L'affinité des aptamères obtenus après 4 cycles de sélection ( $K_d \sim 800$  nM) est comparable à celle d'aptamères ARN issus de sélections conventionnelles ( $K_d$  de 370-470 nM après 12 cycles de sélection avec séparation par chromatographie d'affinité [47]).

## ***II. 5. 1. 2. Sélection de « smart aptamers » par électrophorèse capillaire cinétique (KCE)***

Les méthodes de sélection conventionnelles, de même que le CE-SELEX, ne permettent pas de maîtriser les valeurs des paramètres d'interaction (constante de dissociation  $K_d$ , vitesse de formation  $k_{on}$  et de dissociation  $k_{off}$ ) des aptamères obtenus. Pourtant, de nombreuses applications sont susceptibles de nécessiter l'utilisation d'aptamères possédant des paramètres d'interaction thermodynamiques et cinétiques prédéfinis, appelés « smart aptamers » [48]. Par exemple, le dosage quantitatif d'un analyte requiert l'utilisation d'un panel de sondes possédant une gamme d'affinité ( $K_d$ ) du même ordre de grandeur que la gamme de concentration de l'analyte. Le contrôle des paramètres cinétiques présente également un intérêt pour le développement d'agents thérapeutiques possédant des propriétés pharmacocinétiques définies. En effet, le traitement de pathologies aiguës privilégie l'emploi de ligands possédant des vitesses de formation/dissociation élevées, alors que des cinétiques plus lentes sont préférables lorsqu'il s'agit d'affections chroniques. D'autre part, les « smart aptamers » pourraient contribuer significativement à l'amélioration des techniques de purification, qui nécessitent des ligands d'affinité modérés afin de faciliter l'élution de la cible dans des conditions non dénaturantes.

Krylov et ses collaborateurs ont développé deux techniques d'électrophorèse capillaire cinétique (kinetic capillary electrophoresis, KCE [48]) permettant de sélectionner des « smart aptamers ». L'électrophorèse capillaire hors équilibre de mélanges en équilibre (nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures, NECEEM [49]) fournit des aptamères possédant des valeurs de paramètres d'interaction ( $K_d$ ,  $k_{off}$  et  $k_{on}$ ) prédéfinies, tandis que l'électrophorèse capillaire en équilibre de mélanges en équilibre (equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures, ECEEM [50]) permet de contrôler l'affinité ( $K_d$ ) des aptamères sélectionnés.

## II. 5. 1. 2. 1. Sélection par NECEEM

Le principe de la sélection par NECEEM (Figure 9) est semblable à celui du CE-SELEX [49] : la banque initiale est incubée avec la cible, puis le mélange en équilibre est séparé dans des conditions hors équilibre, c'est-à-dire dans un électrolyte de séparation ne contenant aucun des composés du mélange (acide nucléique ou cible). Les profils électrophorétiques obtenus en NECEEM présentent des pics correspondant à l'ADN libre, à la cible libre et au complexe aptamère-cible, ainsi que des portions exponentielles générées par la dissociation du complexe pendant la migration. Le choix judicieux de la fenêtre temporelle de collection permet alors de sélectionner les aptamères possédant les paramètres d'interaction ( $K_d$ ,  $k_{on}$  et  $k_{off}$ ) souhaités.

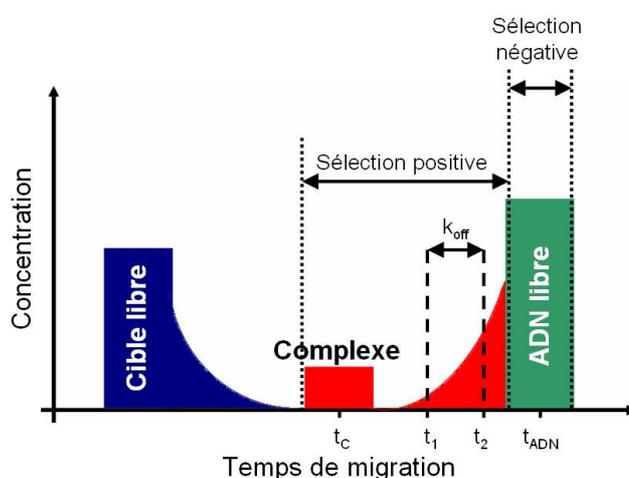


Figure 9 : Principe de la sélection par NECEEM (d'après [49]).

Les sélections « positive » et « négative » sont définies comme la collection de la fraction d'ADN respectivement en équilibre avec le complexe et libre. Dans le mélange en équilibre, les séquences d'ADN possédant un  $K_d$  inférieur à la concentration en cible libre  $[T]$  sont majoritairement liées à la cible, alors que celles possédant un  $K_d$  supérieur sont majoritairement libres. La sélection positive conduit donc à des  $K_d < [T]$ , et la sélection négative à des  $K_d > [T]$ . L'alternance de sélections positives avec une concentration  $[T]_1$  de cible libre, et de sélections négatives avec une concentration  $[T]_2$  en cible libre inférieure permet donc de sélectionner des aptamères avec une gamme limitée d'affinité (Equation 1) :

$$[T]_2 < K_d < [T]_1 \quad (1)$$

D'autre part, la fenêtre temporelle utilisée ( $t_1$  à  $t_2$ ) pour la sélection positive permet de définir précisément le  $k_{off}$ , selon la relation suivante (Equation 2) :

$$k_{off} = \frac{t_{ADN} - t_C}{t_C(t_1 - t_2)} \ln\left(\frac{t_{ADN} - t_2}{t_{ADN} - t_1}\right) \quad (2)$$

avec  $t_C$  et  $t_{ADN}$  les temps de migration du complexe aptamère-cible et de l'ADN libre, respectivement. Des aptamères ont ainsi été sélectionnés contre la protéine MutS (protéine permettant la reconnaissance du mésappariement de l'ADN) en utilisant deux fenêtres de collection spécifiques [48]. Les valeurs expérimentales de  $k_{off}$  obtenues après deux cycles de sélection se sont avérées conformes aux prédictions théoriques, démontrant ainsi la validité du modèle.

Lorsque des aptamères sont sélectionnés dans une gamme limitée de  $K_d$  et de  $k_{off}$ , la gamme de  $k_{on}$  est également définie du fait de la relation existant entre les trois constantes (Equation 3) :

$$k_{on} = \frac{k_{off}}{K_d} \quad (3)$$

Une autre façon de sélectionner des aptamères dans une certaine gamme de  $k_{on}$  est de contrôler le temps d'incubation de manière à ce que seules les séquences possédant un  $k_{on}$  élevé atteignent l'équilibre. L'alternance de sélections positives avec un temps d'incubation  $\tau_1$  et de sélections négatives avec un temps d'incubation plus court  $\tau_2$  permet de sélectionner des aptamères possédant un  $k_{on}$  dans la gamme suivante (Equation 4) :

$$(\ln 2) / [T]\tau_1 < k_{on} < (\ln 2) / [T]\tau_2 \quad (4)$$

avec  $[T]\tau_1$  et  $[T]\tau_2$  la concentration en cible libre aux instants  $\tau_1$  et  $\tau_2$ .

L'optimisation de la position et de la largeur de la fenêtre de collection permet également de contrôler l'efficacité de la séparation des séquences libres et liées, et donc d'améliorer les performances de la sélection. La NECEEM a ainsi permis de sélectionner des aptamères avec une constante de dissociation de l'ordre du nM pour la protéine farnesyltransférase (PTFase) en un seul cycle de sélection [49].

## II. 5. 1. 2. 2. Sélection par ECEEM

L'ECEEM peut être utilisée afin de réaliser une sélection « thermodynamique » d'aptamères possédant des  $K_d$  prédéterminés [48]. Le principe (Figure 10) est le même, que pour la NECEEM à la différence que l'électrolyte de séparation contient la cible à une

concentration identique à celle du mélange à l'équilibre, ce qui permet de maintenir un quasi-équilibre dynamique entre la cible et les aptamères pendant la séparation.

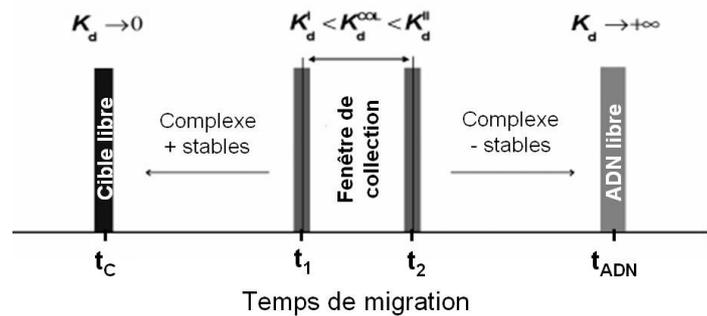


Figure 10 : Principe de la sélection par ECEEM de «smart aptamers» ayant un  $K_d$  prédéfini [48]

Les aptamères sont donc complexés avec la cible pendant une partie du temps de séparation, et libres le reste du temps. Plus la valeur du  $K_d$  est faible, plus les aptamères passent de temps sous forme complexée, donc plus leur temps de migration est proche de celui du complexe ( $t_c$ ). A l'inverse, plus le  $K_d$  est grand, plus les aptamères passent de temps sous forme libre, donc plus leur temps de migration est proche de celui de l'ADN libre ( $t_{ADN}$ ). Le temps de migration  $t$  dépend donc du  $K_d$  et de la concentration en cible libre  $[T]$  selon l'expression suivante [50] (Equation 5) :

$$\frac{1}{t} = \frac{1}{t_{ADN}} \frac{K_d}{[T] + K_d} + \frac{1}{t_c} \frac{[T]}{[T] + K_d} \quad (5)$$

Si la cible est en excès par rapport aux aptamères, la concentration en cible libre peut être assimilée à la concentration initiale  $[T]_0$ . Dans ces conditions, le réarrangement de la formule précédente permet d'exprimer le  $K_d$  des aptamères en fonction de leur temps de migration et de la concentration en cible [50] (Equation 6) :

$$K_d(t) = [T]_0 \frac{t_{ADN}}{t_c} \frac{t - t_c}{t_{ADN} - t} \quad (6)$$

Le choix d'une fenêtre de collection adaptée ( $t_1 - t_2$ ) permet donc de sélectionner des aptamères ayant un  $K_d$  compris entre  $K_d^1(t_1)$  et  $K_d^2(t_2)$ .

L'ECEEM a été utilisée pour sélectionner des « smart aptamers » dirigés contre la protéine MutS [50]. Dans un premier temps, les temps de migration de l'ADN et du complexe ( $t_{ADN}$  et  $t_C$ ) sont déterminés par NECEEM (absence de cible dans l'électrolyte de séparation), puis la sélection par ECEEM est réalisée en utilisant trois fenêtres de collection différentes. Après trois cycles de sélection-amplification, les  $K_d$  des banques enrichies obtenues (déterminés par NECEEM) ont suffisamment convergé vers les valeurs prédites par la théorie (Figure 11).

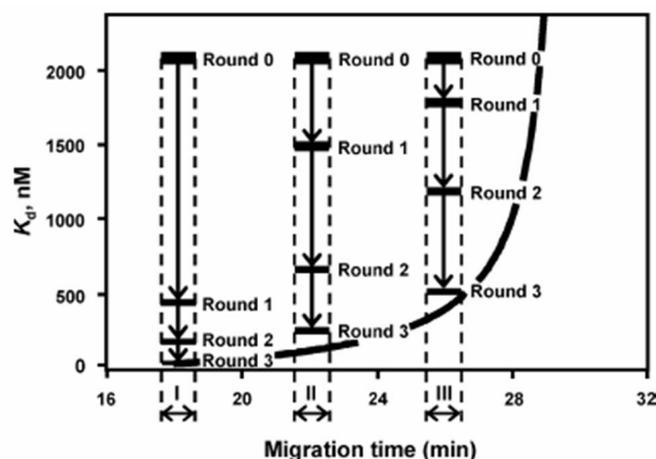


Figure 11 : Distribution théorique des  $K_d$  en fonction du temps de migration (courbe pleine) et  $K_d$  expérimentaux obtenus au cours des trois cycles de sélection pour les trois fenêtres de collection (barres horizontales) [50]

### II. 5. 1. 3. Sélection non-SELEX

Récemment, un procédé de sélection non-SELEX, impliquant la répétition d'étapes de sélection sans amplification (Figure 12), a également été développé, en utilisant l'électrophorèse capillaire comme technique de séparation [51,52].

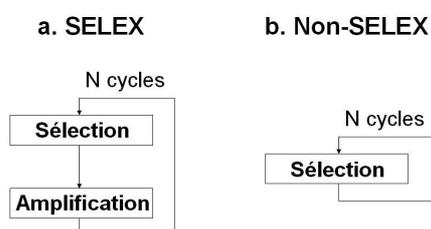


Figure 12 : Représentation schématique du procédé SELEX (a) et non-SELEX (b) (d'après [51])

Une sélection par NECEEM d'aptamères dirigés contre la protéine h-Ras a ainsi été décrite [51]. Après trois cycles de sélection non-SELEX, l'affinité de la banque enrichie obtenue est améliorée de quatre ordres de grandeur (de  $> 10$  mM à  $0,3 \mu\text{M}$ ) et similaire à celle obtenue par SELEX ( $0,6 \mu\text{M}$ ). L'absence d'amplification par PCR entre chaque cycle de sélection

permet de réduire considérablement le temps nécessaire pour obtenir l'aptamère recherché, le processus entier pouvant être effectué en une heure seulement au lieu de plusieurs jours (CE-SELEX), voire plusieurs semaines (SELEX conventionnel).

## II. 5. 2. Tailored-SELEX

La banque initiale d'oligonucléotides est composée de séquences possédant une région variable (en général de 60 à 90 nucléotides) encadrée par deux régions fixes (de 15 à 25 nucléotides) permettant l'amplification par PCR et la transcription. Or la synthèse d'oligonucléotides n'est effectivement applicable qu'en deçà de 60 bases, chaque nucléotide incorporé diminuant le rendement et augmentant les coûts de production. C'est pourquoi les aptamères identifiés doivent généralement être tronqués avant de pouvoir être produits à plus grande échelle. Cependant, les régions fixes pouvant éventuellement participer à l'interaction avec la cible ou s'hybrider avec la région variable, leur troncation peut entraîner une modification de l'affinité pour la cible. Des tests doivent donc être effectués de façon empirique, ce qui prend du temps sans nécessairement conduire à un résultat satisfaisant.

Une méthodologie a donc été développée afin d'éviter cette étape fastidieuse de troncation. Appelée tailored-SELEX, cette variante du procédé SELEX conventionnel a permis d'isoler des aptamères dirigés contre le peptide associé au gène de la calcitonine (CGRP) à partir de séquences ARN comportant seulement 10 nucléotides fixes en plus de la région variable [53]. Les promoteurs sont ensuite ajoutés par ligation à l'aide d'adapteurs avant l'étape d'amplification, et sont retirés après. Par rapport à une sélection conventionnelle, ce procédé ne nécessite donc que deux étapes supplémentaires.

## II. 5. 3. « Toggle » SELEX

Le procédé SELEX permet de sélectionner des aptamères présentant une spécificité élevée pour leur cible. Pourtant, cette absence de réactivité croisée peut être un inconvénient lors de l'évaluation pré-clinique de molécules potentiellement thérapeutiques, effectuée sur des modèles animaux. Des molécules générées contre des protéines humaines et démontrant une excellente efficacité *in vitro* peuvent ainsi ne pas entrer en phase d'essais cliniques du fait de leur manque d'efficacité lors des expérimentations animales.

C'est pourquoi une stratégie permettant la sélection d'aptamères présentant une plus large gamme de spécificités a été développée. Ce procédé, appelé « toggle » SELEX (de

l'anglais *toggle* : réversible, changeant de sens) est basé sur l'alternance de cycles de sélection mettant en œuvre des cibles analogues [54]. Les aptamères obtenus reconnaissent les différentes cibles, probablement en se liant à des domaines communs. Des aptamères permettant d'inhiber l'activité de la thrombine humaine et porcine ont ainsi pu être sélectionnés par cette méthode [54].

## II. 5. 4. Expression cassette SELEX

Des aptamères peuvent être générés contre de nombreuses cibles protéiques présentant un intérêt thérapeutique. Souvent, ces aptamères sont capables de bloquer l'activité enzymatique de leur cible, d'où l'idée de les utiliser comme agents thérapeutiques pour le traitement des maladies associées à cette activité. Cependant, un des principaux obstacles à l'efficacité *in vivo* des aptamères est leur vectorisation jusqu'à la molécule-cible, en particulier lorsqu'il s'agit de protéines intracellulaires. Les aptamères à ARN pouvant être exprimés à l'intérieur des cellules, une stratégie consiste à insérer la séquence sélectionnée au sein d'un vecteur rétroviral, puis à transfecter la cellule contenant la protéine-cible. La vectorisation d'une séquence d'ARN sélectionnée contre la transcriptase inverse du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1 RT) a ainsi permis de bloquer la réplication du virus dans des cellules humaines infectées [55]. Cependant, l'expression intracellulaire de l'aptamère nécessite l'insertion de la séquence fonctionnelle dans une cassette d'expression. La transcription de cette cassette par les ARN polymérases cellulaires va produire un transcrit chimérique comprenant, d'une part, le domaine actif et, d'autre part, les éléments nécessaires à son expression. Les séquences additionnelles encadrant l'aptamère sont donc susceptibles de modifier sa conformation et ainsi d'altérer ses capacités de reconnaissance et d'inhibition de la protéine-cible. Afin que l'ARN chimérique conserve son efficacité, l'insertion de la séquence fonctionnelle dans la cassette d'expression doit donc être optimisée. La stratégie appelée expression cassette SELEX consiste ainsi à faire varier aléatoirement les séquences encadrant l'aptamère puis à sélectionner les aptamères chimériques fonctionnels [56]. Des aptamères ARN inhibant le facteur de transcription E2F ont ainsi été obtenus [56].

## II. 5. 5. SELEX génomique

Les interactions entre protéines et acides nucléiques ont une grande importance biologique. En effet, de nombreuses protéines sont capables de réguler l'expression des gènes

par interaction avec des acides nucléiques spécifiques *in vivo*. Une variante du SELEX conventionnel, appelée SELEX génomique, permet d'identifier rapidement des séquences naturelles présentant une affinité élevée pour les cibles protéiques, indépendamment de leurs conditions d'expression [57,58]. Cette méthode nécessite l'utilisation d'une banque initiale dérivée du génome de l'organisme d'intérêt, constituée de fragments de l'ADN génomique suffisamment courts (50 à 500 nucléotides) auxquels sont adjointes les séquences fixes. Les étapes de sélection et d'amplification sont ensuite semblables à celles utilisées pour le SELEX conventionnel. Afin d'éviter l'hybridation des séquences promotrices avec les fragments génomiques, susceptible de perturber l'interaction avec la cible, une méthode appelée *primer-free genomic SELEX* a été développée, et a notamment permis d'identifier des séquences dirigées contre une protéine issue du génome d'un bactériophage [59]. Les séquences promotrices sont totalement retirées avant l'étape de sélection, puis régénérées grâce à des cycles d'hybridation-extension afin de permettre l'amplification des fragments génomiques sélectionnés.

## II. 5. 6. Photo-SELEX (SELEX covalent)

Le photo-SELEX, également appelé SELEX covalent, est une variante du SELEX conventionnel permettant de sélectionner des oligonucléotides via la formation d'une liaison covalente photoinduite avec la cible [60,61]; les aptamères ainsi obtenus sont appelés photoaptamères. La banque initiale est composée d'oligonucléotides au sein desquels est incorporé un nucléotide modifié par l'ajout d'un groupement substituant auxochrome sur le noyau aromatique de la base azotée (brome ou iode en position 5 du cycle aromatique ou thiol en position 4) [12]. A chaque cycle de sélection, l'irradiation par un rayonnement ultraviolet (UV) induit la formation d'une liaison covalente par réticulation (cross-linking) entre les oligonucléotides modifiés et la cible protéique. L'amplification par PCR est précédée d'une étape de digestion par une protéinase afin d'éliminer la partie protéique des complexes formés [61].

La 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU) est un nucléotide modifié dont la photochimie est bien adaptée à ce procédé. Grâce à l'effet bathochrome dû à la substitution du cycle aromatique par le brome, le chromophore 5-bromouracil absorbe le rayonnement UV dans une gamme de longueurs d'onde (310 nm) où les chromophores des acides nucléiques naturels et des protéines n'absorbent pas ou très peu. La conversion intersystème de l'état singulet excité en état triplet de plus basse énergie permet alors la réticulation spécifique avec

les acides aminés aromatiques et soufrés de la cible protéique, lorsque celle-ci est suffisamment proche. En se basant sur ce principe, des aptamères dirigés contre le facteur de croissance basique des fibroblastes humains (bFGF155) ont été sélectionnés à partir d'une banque d'oligonucléotides possédant une BrdU à la place de la thymidine [61]. Deux des photoaptamères obtenus permettent de détecter le bFGF155 avec une sensibilité exceptionnelle et de discriminer aisément avec des facteurs de croissance consanguins liant l'héparine. L'utilisation de photoaptamères permet ainsi d'améliorer la sensibilité et la spécificité de la reconnaissance moléculaire, car la formation de la liaison covalente requiert un arrangement mutuel particulier de l'acide nucléique et des sites de la protéine impliqués dans la liaison. Après immobilisation covalente sur un support solide, les photoaptamères peuvent être utilisés comme agents de capture spécifique dans le développement de systèmes miniaturisés pour le diagnostic clinique ou l'analyse protéomique [61,62].

## II. 5. 7. SELEX automatisé

Les manipulations nécessaires au processus de sélection *in vitro* sont longues et répétitives. Une dizaine de cycles de sélection étant en général nécessaire pour générer des aptamères, la plupart des expériences de sélection durent plusieurs semaines, voire quelques mois. De plus le processus doit être répété intégralement pour chaque nouvelle cible, les manipulations manuelles ne permettant pas les sélections multiples en parallèle. Plusieurs tentatives d'automatisation du protocole ont donc été proposées [63-66]. Outre un gain de temps significatif (3,5 heures par cycles, soit moins de 2 jours pour un processus complet comportant 12 cycles de sélection [63,64]), l'automatisation permet une plus grande flexibilité et versatilité dans le choix des conditions de sélection (tampon, réactifs, stringence) dont elle facilite l'optimisation [67]. En outre, les systèmes automatisés sont capables de procéder à des sélections multiples menées en parallèle, ce qui permet d'effectuer des criblages à haut débit.

L'applicabilité de cette méthode à la sélection d'oligonucléotides dirigés contre des protéines a été démontrée par la sélection automatisée d'aptamères anti-lysozyme (séparation par filtration sur membrane) [64]. La séquence majoritaire obtenue (5'-ATC AGG GCT AAA GAG TGC AGA GTT ACT TAG-3') présente une affinité élevée pour le lysozyme (constante de dissociation de 31 nM) ainsi qu'une activité inhibitrice *in vitro*. Afin d'éviter la purification des cibles protéiques, processus long et fastidieux, ce protocole a été couplé à un système permettant de générer les protéines d'intérêt par transcription et traduction *in vitro* à partir des gènes correspondants [65]. Une étape de biotinylation *in vitro* a également été mise

en place afin d'immobiliser spécifiquement les cibles lors de l'étape de sélection. Des aptamères ARN énantiomères (spiegelmers) dirigés contre la substance P (peptide composé de 11 acides aminés) ont également été sélectionnés à l'aide d'un système automatisé [68].

Récemment, le développement d'un système de sélection automatisé miniaturisé a été décrit pour la sélection et la synthèse d'un aptamère anti-lysozyme de séquence identique [69]. En effet, la microfluidique présente des avantages significatifs par rapport aux systèmes automatisés classiques (réduction de taille, de complexité et de coût) et pourrait en outre ouvrir la voie à diverses applications à haut débit.

## II. 5. 8. AFM-SELEX

Récemment, une stratégie de sélection par microscopie à force atomique (Atomic Force Microscopy, AFM), baptisée AFM-SELEX, a été développée pour la sélection d'aptamères de haute affinité [70]. Cette méthode est basée sur une mesure dynamique de la force d'adhésion entre une surface d'or fonctionnalisée par la molécule-cible et un levier fonctionnalisé par une banque d'oligonucléotides simple brin (Figure 13).

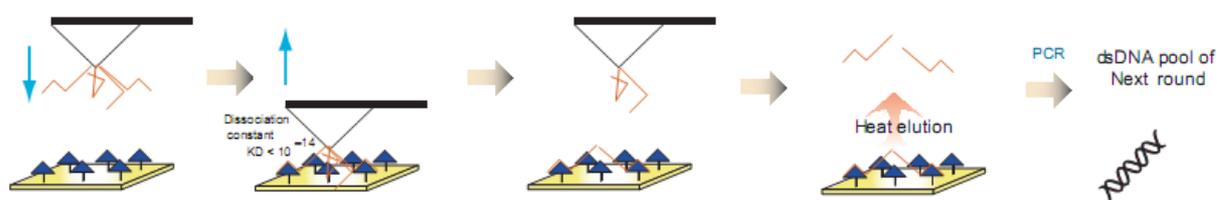


Figure 13 : représentation schématique de la stratégie de sélection AFM-SELEX [70]

Ce processus a été employé pour la sélection d'aptamères dirigés contre la thrombine [70]. Après seulement trois cycles de sélections, la plupart des séquences obtenues présentent une affinité pour la cible plus élevée que l'aptamère issu du SELEX conventionnel. Des mesures d'affinité par polarisation de fluorescence ont ainsi montré que l'un des aptamères sélectionnés (séquence : 5'-CCT AGT GTG CGT CGA TGG GGT GGG GTG GGG CTG AGT TGG GGG GTG GGA TCA ATC AAT CTG GTT T-3') présentait un  $K_d$  de 200 pM, soit environ 1000 fois plus faible que celui de l'aptamère anti-thrombine conventionnel ( $K_d \sim 200$  nM).

## II. 6. Exemples de sélection

Contrairement aux anticorps qui ne peuvent être obtenus que contre des cibles provoquant une réaction immunitaire, les aptamères peuvent être sélectionnés contre tout type de cible : petites molécules, acides nucléiques, protéines, ainsi que des cibles plus complexes telles que des virus ou des cellules. Le Tableau 3 dresse une liste non exhaustive de cibles contre lesquelles ont été sélectionnés des aptamères.

Tableau 3 : Exemples de cibles contre lesquelles ont été sélectionnés des aptamères (liste non exhaustive)

Cible	Type d'aptamère	Méthode de sélection	Nombre de cycles	K <sub>d</sub>	Référence
<b><u>Petites molécules</u></b>					
<b><i>Cations inorganiques</i></b>					
Ni <sup>2+</sup>	ARN	SELEX	8	0,8 - 29 μM	[71]
Zi <sup>2+</sup>	ARN	SELEX		1,2 mM	[72]
<b><i>Petites molécules organiques</i></b>					
Ethanolamine	ADN	SELEX	10	6 - 19 nM	[73]
<b><i>Nucléotides et dérivés</i></b>					
ATP / Adénosine	ADN	SELEX	8	6 μM	[74]
	ARN	SELEX		0,7 - 8 μM	[75]
<b><i>Bases xanthiques</i></b>					
Théophylline	ARN	SELEX		100 nM	[30]
	ARN	Modélisation moléculaire		60 μM	[76]
<b><i>Cofacteurs</i></b>					
NAD	ARN	SELEX	9	2,5 μM	[77]
Riboflavine	ARN	SELEX	9	1 - 5 μM	[77]
<b><i>Acides aminés et dérivés</i></b>					
L-arginine	ARN	SELEX	20	330 nM	[78]
	ARN	SELEX	4	56 μM	[79]
L-citrulline	ARN	SELEX	7	62 - 68 μM	[79]
L-histidine	ARN	SELEX	6	8 - 54 μM	[80]
<b><i>Oligosaccharides</i></b>					
Cellobiose	ADN	SELEX	14	1 - 100 μM	[81]

Cible	Type d'aptamère	Méthode de sélection	Nombre de cycles	K <sub>d</sub>	Référence
<b>Peptides</b>					
Asp f1 (allergène)	ADN	SELEX	13	93,6 nM	[82]
CGRP	ARN	Tailored-SELEX	15	2,5 nM	[53]
Neuropeptide Y	ADN	CE-SELEX	4	800 nM	[41,42]
	ARN	SELEX	12	370 - 470 nM	[47]
Substance P	ARN	SELEX	12 + 12	190 nM	[27]
	ARN	SELEX automatisé	14	40 nM	[68]
Vasopressine	ADN	SELEX	13	1,2 µM	[83]
<b>Aminoglycosides</b>					
Kanamycine	ARN	SELEX automatisé	12	10 - 30 nM	[66]
Néomycine	ARN	SELEX automatisé	12	1 - 10 nM	[66]
Streptomycine	ARN	SELEX	7	nd*	[84]
Tobramycine	ARN	SELEX automatisé	12	30 - 100 nM	[66]
<b>Acides nucléiques</b>					
ARN TAR du VIH-1	ADN	SELEX	15	50 nM	[85]
	ARN	SELEX	10	20 - 50 nM	[86]
<b>Protéines</b>					
Aβ40 (trimère)	ARN	SELEX	12	29 - 48 nM	[87]
h-Ras	ADN	Non-SELEX	3	0,2 µM	[51]
MutS	ADN	CE-SELEX	3	15 - 860 nM	[48]
<b>Enzymes</b>					
Lysozyme	ADN	SELEX automatisé	12	31 nM	[64]
	ADN	SELEX automatisé		nd	[69]
	ADN	CE-SELEX	5	2,8 - 52,9 nM	[45]
PTFase	ADN	CE-SELEX	1	0,5 - 10 nM	[49]
PTPase	ARN	SELEX	8	18 - 28 nM	[88]
RT du VIH-1	ADN	SELEX	12	1 nM	[17]
	ADN	CE-SELEX	4	180 pM	[89]
	ARN	Expression cassette SELEX		25 pM	[55]
Thrombine	ARN	Toggle-SELEX	13	1 - 4 nM	[54]
<b>Facteurs de croissance</b>					
bFGF	ADN	PhotoSELEX	6	16 pM	[61]
VEGF	ARN	SELEX		0,1 - 2 nM	[90]
	ARN	SELEX	12	0,05 - 0,13 nM	[91]

<b>Cible</b>	<b>Type d'aptamère</b>	<b>Méthode de sélection</b>	<b>Nombre de cycles</b>	<b>K<sub>d</sub></b>	<b>Référence</b>
<b><i>Facteurs de transcription</i></b>					
TTF1	ADN	SELEX	15	3 - 67 nM	[92]
<b><i>Glycoprotéines</i></b>					
IgE humaine	ADN	CE-SELEX	4	29 nM	[41,42]
	ARN	SELEX	15	35 nM	[43]
	ADN	SELEX	15	10 nM	[43]
Ricine	ARN	SELEX	9	7,3 nM	[93]
	ADN	SELEX	9	100 - 600 nM	[44]
	ADN	CE-SELEX	4	50 - 200 nM	[44]
<b><u>Structures complexes</u></b>					
<b><i>Organelles</i></b>					
Ribosome	ARN	SELEX		4 - 5 nM	[94]
<b><i>Virus</i></b>					
Sarcome de Rous	ARN	SELEX	12	nd*	[95]
<b><i>Cellules</i></b>					
Cellules de leucémie	ADN	Cell-SELEX	20	0,8 - 229 nM	[96]

\*nd : non déterminé

### III. Applications

Les aptamères peuvent être utilisés dans le cadre de nombreuses applications impliquant un phénomène de reconnaissance moléculaire. Employés depuis 40 ans comme agents thérapeutiques ou de diagnostic, ils sont également depuis plus récemment utilisés dans des applications analytiques, en tant que ligands immobilisés ou dans des dosages en phase homogène.

#### III. 1. Applications thérapeutiques

L'utilisation des acides nucléiques comme agents thérapeutiques a débuté dans les années 1970 avec le développement des stratégies antisens [97] (Figure 14). Un antisens est un acide nucléique simple brin capable de stopper la synthèse d'une protéine par hybridation de séquence complémentaire avec l'ARN messager correspondant. L'interaction d'un aptamère avec sa cible obéit cependant à un mécanisme fondamentalement différent, qui s'apparente plutôt à celui des anticorps monoclonaux et des petites molécules thérapeutiques. La formation du complexe aptamère/cible permet ainsi d'envisager un grand nombre d'applications thérapeutiques, telles que la régulation de l'expression génique ou l'inhibition de l'activité protéique extra- ou intracellulaire. Le champ des affections cliniques pouvant potentiellement être traitées grâce aux acides nucléiques s'est donc considérablement élargi.

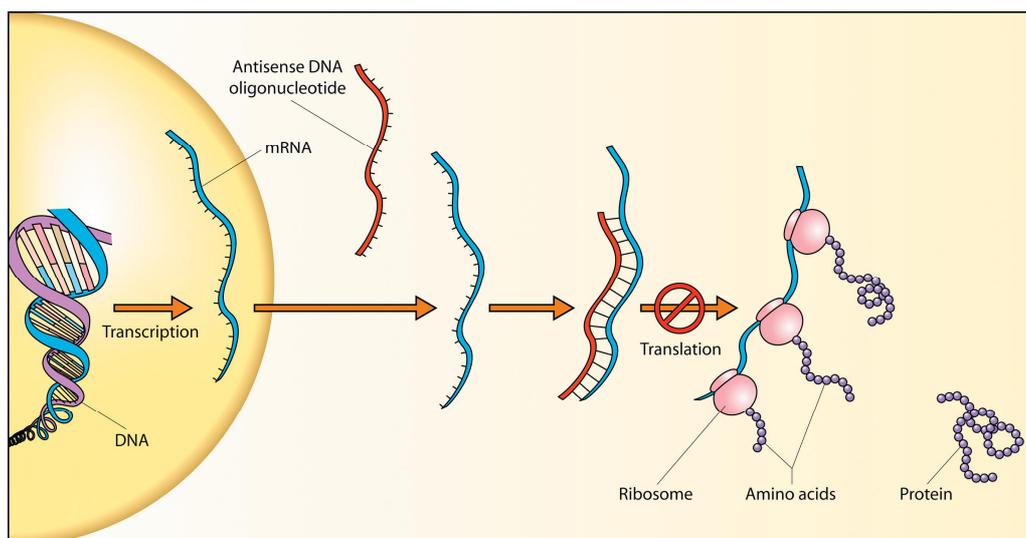
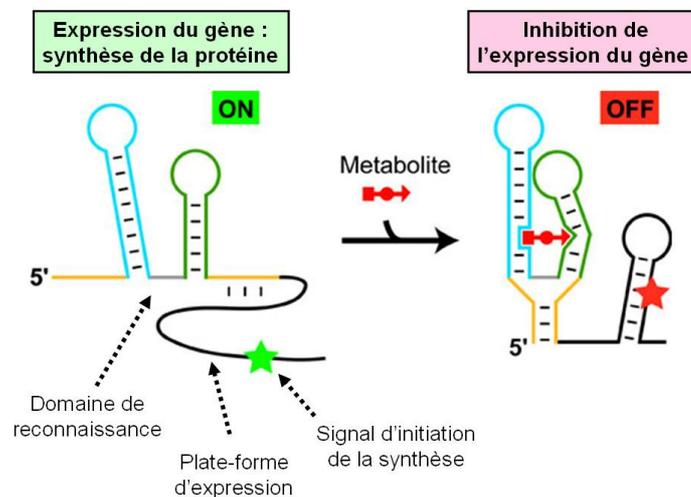


Figure 14 : Représentation schématique de la stratégie antisens [98]

### III. 1. 1. Régulation de l'expression génique

Il est possible de contrôler l'expression d'un gène donné par insertion d'un aptamère en amont de l'ARN messager (ARNm) correspondant. L'addition de la cible entraîne la formation d'un complexe avec l'aptamère, ce qui inhibe de façon dose-dépendante la traduction de l'ARNm par les ribosomes et donc la synthèse de la protéine codée par cet ARN. Cette approche a été développée *in vitro* et *in cellulo* en utilisant des aptamères dirigés contre des petites molécules telles que la tobramycine, un antibiotique [99].

Ce mécanisme s'inspire des motifs dits « riboswitchs » : ces structures ARN trouvées chez différentes bactéries sont des aptamères naturels de petites molécules (acides aminés, cofacteurs...). La présence de cette petite molécule conduit à la formation d'un complexe avec le riboswitch, qui active ou désactive l'expression d'un gène adjacent, au niveau de la traduction ou de la transcription [100] (Figure 15). Le gène contrôlé code généralement pour une enzyme impliquée dans une voie métabolique de la petite molécule régulatrice, permettant ainsi une boucle de rétrocontrôle [3]. L'utilisation de riboswitchs synthétiques peut également être envisagée pour « reprogrammer » la réponse de bactéries à des petites molécules, dans un but thérapeutique (synthèse et administration de médicaments) ou environnemental (détection et élimination de polluants) [101].



**Figure 15 : Représentation schématique du fonctionnement d'un riboswitch.** Exemple du riboswitch spécifique de la thiamine pyrophosphate (une coenzyme de transfert), qui inhibe la synthèse de cette protéine en présence de l'un de ses métabolites (d'après [102])

Une variante de cette stratégie consiste à utiliser un antisens (séquence complémentaire) du gène cible. En l'absence de la cible reconnue par l'aptamère, le repliement de la séquence oligonucléotidique séquestre l'antisens dans une région appariée, le rendant donc inactif. L'addition de la molécule cible entraîne un changement conformationnel

de l'aptamère, qui libère l'antisens et permet ainsi son association à la séquence complémentaire du gène cible, qui se trouve alors inhibé [103].

### III. 1. 2. Inhibition protéique intracellulaire

Des aptamères peuvent être générés contre de nombreuses cibles protéiques présentant un intérêt thérapeutique. Lorsque ces aptamères présentent, outre leur affinité, la capacité d'inhiber l'activité enzymatique de leur cible, il est possible de les utiliser comme agents thérapeutiques pour le traitement des maladies associées à cette activité.

Lorsqu'il s'agit de protéines intracellulaires, l'approche la plus pertinente est l'expression de l'aptamère (qui prend alors le nom d'intramères) in situ dans la cellule, via une cassette d'expression. Il a ainsi été possible de générer dans un modèle cellulaire un aptamère anti-Rev inhibant la production de VIH-1 [104]. Cependant, l'un des inconvénients majeurs de cette méthode est l'absence de contrôle précis de l'inhibition de la protéine une fois l'aptamère exprimé dans la cellule. Pour rendre possible cette régulation, il suffit d'introduire un critère de sélection supplémentaire lors du procédé SELEX : la dissociation du complexe aptamère/cible par addition d'une petite molécule (par exemple la néomycine connue pour sa capacité à se lier à l'ARN) [105] (Figure 16). Il est alors envisageable de contrôler l'activité d'une protéine in vivo, en l'inhibant par le biais d'un intramère et en levant cette inhibition au moment souhaité par l'ajout d'une petite molécule spécifique.

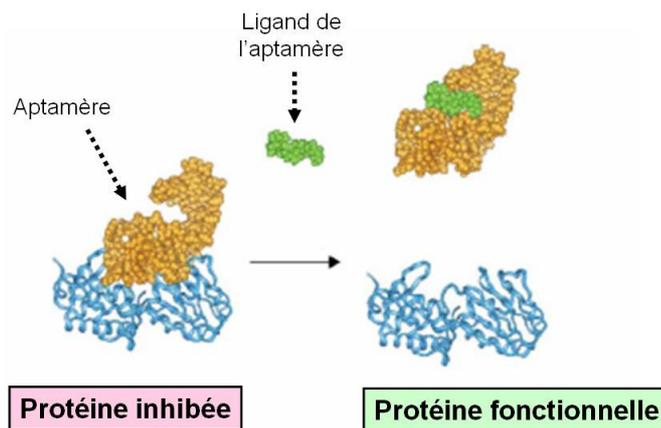


Figure 16 : Régulation de l'activité protéique in vivo à l'aide d'un aptamère et d'un ligand spécifique [105]

### III. 1. 3. Inhibition de cibles extracellulaires

Contrairement aux autres approches thérapeutiques fondées sur l'utilisation des oligonucléotides (antisens, ARN interférent...), les aptamères sont également capables de

reconnaître des marqueurs extracellulaires, beaucoup plus accessibles *in vivo* que les cibles intracellulaires. De nombreux aptamères sont donc actuellement développés contre des cibles extracellulaires présentant un intérêt biomédical : facteurs de coagulation et de croissance, hormones, anticorps impliqués dans les maladies auto-immunes, marqueurs d'inflammation, neuropeptides, récepteurs membranaires [106]...

L'aptamère anti-thrombine est ainsi le premier oligonucléotide à avoir été sélectionné contre une protéine extracellulaire [107]. La thrombine est une protéase (enzyme clivant des liaisons peptidiques) qui catalyse la transformation du fibrinogène en fibrine, responsable de la coagulation sanguine ainsi que de la thrombose, formation pathologique d'un caillot sanguin. Doté d'une affinité élevée pour la thrombine ( $K_d \sim 10^{-7}$  M), l'aptamère ADN sélectionné présente en outre une activité inhibitrice *in vitro* [107] et *in vivo* [108] se traduisant par une augmentation du temps de coagulation plasmatique. Contrairement à l'héparine, inhibiteur naturel des protéases impliquées dans la cascade de la coagulation, l'effet anti-coagulant de l'aptamère anti-thrombine disparaît quasi instantanément après la fin de la perfusion du fait de la dégradation très rapide de l'aptamère par les nucléases sanguines (demi-vie de l'ordre de 100 secondes chez le singe [108]). L'aptamère anti-thrombine a donc été développé essentiellement comme anti-coagulant pour des applications chirurgicales nécessitant un circuit extracorporel [108].

Cependant, la plupart des applications thérapeutiques nécessitent une stabilité accrue des aptamères. Le passage de l'expérimentation *in vitro* à l'application *in vivo* exige donc un certain nombre d'étapes d'optimisation afin d'améliorer la biodisponibilité des aptamères. Celle-ci dépend de deux propriétés pharmacocinétiques essentielles de la molécule : sa stabilité dans les fluides biologiques ainsi que sa clairance (vitesse d'élimination par l'organisme) [97].

La stabilité plasmatique des oligonucléotides est relativement limitée du fait de leur dégradation rapide par les nucléases. La demi-vie caractéristique d'un acide nucléique dans le plasma sanguin est de 30 à 60 minutes pour l'ADN, et de quelques secondes seulement pour l'ARN [97]. Cette stabilité peut être améliorée grâce à l'utilisation de nucléotides modifiés ou d'aptamères énantiomères (spiegelmers). Des modifications post-sélection peuvent également être envisagées afin d'accroître la stabilité, mais elles s'accompagnent généralement d'une diminution de l'efficacité de l'aptamère.

Du fait de leur petite taille (un aptamère comportant 25 à 40 nucléotides possède un poids moléculaire d'environ 8250 à 13200 Da), les aptamères sont éliminés par voie rénale en quelques minutes seulement [97]. Ainsi, même pour les composés présentant une bonne

stabilité plasmatique, la demi-vie *in vivo* est essentiellement gouvernée par la clairance. L'élimination par l'organisme peut être ralentie en augmentant le poids moléculaire du composé par association avec des entités inertes de grande taille [97]. Ainsi, l'aptamère dirigé contre le facteur de coagulation IXa, sélectionné à partir d'une banque d'ARN modifié 2'-fluoropyrimidine [109,110], a été associée à une molécule de cholestérol en 5' afin de ralentir sa clairance sanguine. Une modulation de l'effet anti-coagulant a ensuite pu être obtenue grâce à une séquence de 17 nucléotides capable de s'hybrider à l'aptamère et agissant comme un antisens pourvu d'un effet antidote spécifique [110]. La clairance d'aptamères dirigés contre le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) a également pu être considérablement réduite par conjugaison avec des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) de longueurs variées [111] ou par fixation de l'aptamère à la surface d'un liposome [112]. Le VEGF est un régulateur essentiel de l'angiogenèse (croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants), phénomène impliqué dans de nombreuses maladies et favorisant notamment la croissance tumorale. Un aptamère dirigé contre le VEGF [91] (NX 1838) a reçu l'approbation de la FDA (Food and Drug Administration) en décembre 2004 pour le traitement de la forme néovasculaire de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) [113]. Connu sous le nom de Macugen® ou Pegaptanib sodium, ce médicament est commercialisé aux Etats-Unis depuis janvier 2005 et a obtenu une autorisation de mise sur le marché en France en mai 2006.

Le cas des protéines membranaires est plus délicat, car l'étape de purification de la cible préalable à la sélection peut entraîner une perte de la conformation native et conduire à la sélection d'un aptamère non fonctionnel *in vivo* [1]. Afin d'éviter cet écueil, des stratégies de sélection sur cellules vivantes ont été développées, permettant notamment l'obtention d'un aptamère contre le récepteur à activité tyrosine kinase oncogénique RET [114].

### **III. 1. 4. Vectorisation de molécules actives**

Même dépourvus d'effet inhibiteur, les aptamères possèdent un fort potentiel thérapeutique *in vivo*, notamment comme molécules d'adressage lorsqu'ils sont associés à une molécule active (radionucléide, toxine, agent cytotoxique) dont ils assurent la vectorisation vers sa cible [115]. Une telle fonctionnalisation a été réalisée avec un aptamère dirigé contre l'élastase neutrophile, une protéase impliquée dans de nombreuses maladies inflammatoires. L'aptamère sélectionné ne présente pas d'activité inhibitrice *in vitro* [116], mais l'attachement covalent à un térapeptide (N-méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val) inhibant

faiblement l'élastase permet d'augmenter l'effet inhibiteur de ce dernier de plus de 100 000 fois [117]. Cette propriété d'adressage a également été exploitée en réalisant une sélection à partir d'une banque composée de séquences ADN conjuguées à un inhibiteur irréversible de l'élastase [118]. Cette variante du procédé SELEX, baptisée SELEX combiné (blended SELEX), a permis d'obtenir des aptamères capables de transporter l'inhibiteur jusqu'au site d'inflammation et permettant d'augmenter d'un facteur 10 000 son activité inhibitrice in vivo [119].

## ***III. 2. Applications analytiques et diagnostic***

### **III. 2. 1. Techniques bioanalytiques**

Les aptamères sont utilisés comme alternative aux anticorps dans des essais bioanalytiques de type ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), ainsi que pour la détection ultrasensible de protéines en PCR d'affinité.

#### ***III. 2. 1. 1. Essais bioanalytiques de type ELISA***

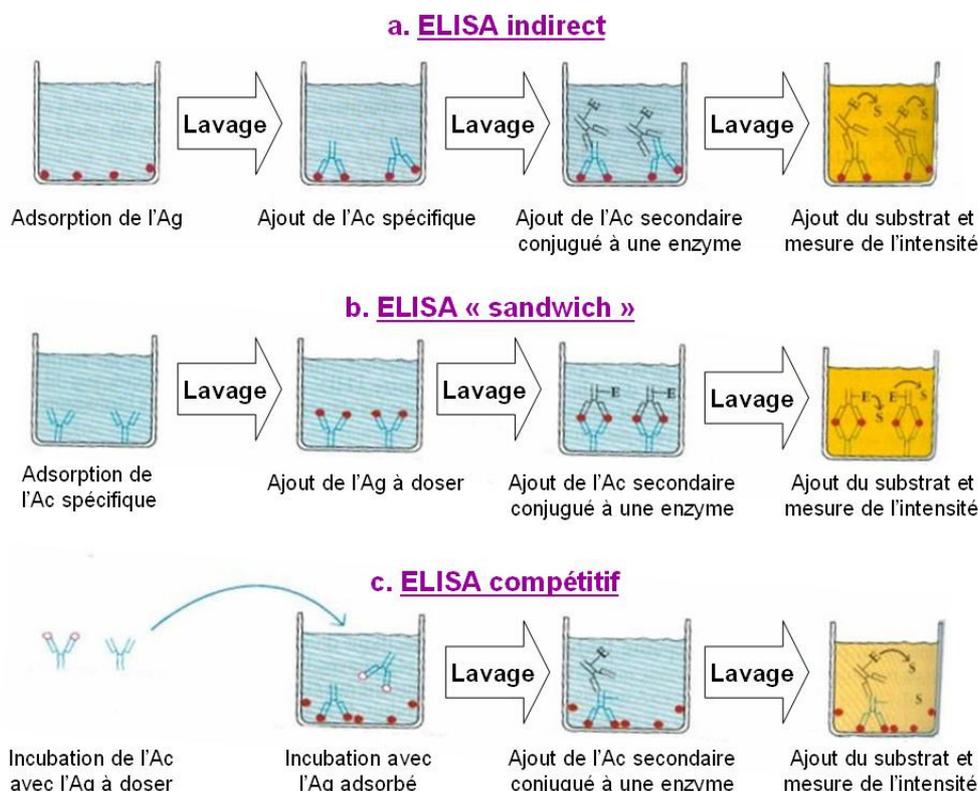
##### **III. 2. 1. 1. 1. Principe de l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)**

L'ELISA est une technique de dosage immunoenzymatique sur support solide. Cet essai bioanalytique utilise deux anticorps : l'un est spécifique de l'antigène, tandis que l'autre réagit aux complexes immuns (antigène-anticorps). Ce dernier, appelé anticorps secondaire, ou anticorps reporteur, est couplé à une enzyme qui catalyse la transformation d'un substrat en composé chromophore ou fluorophore. Il existe différents formats de dosage ELISA : indirect, en « sandwich » ou compétitif.

L'ELISA indirect (Figure 17a) permet le dosage des anticorps par incubation de l'échantillon contenant l'anticorps sur une microplaque recouverte par l'antigène correspondant. L'ajout de l'anticorps secondaire puis du substrat entraîne l'apparition d'un signal lumineux ou fluorescent dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon.

L'ELISA en « sandwich » (Figure 17b) est utilisé afin de détecter un antigène. L'échantillon contenant l'antigène est incubé sur la microplaque recouverte par un anticorps de capture, puis l'anticorps secondaire lié à une enzyme est ajouté. Un substrat est ajouté et est converti par l'enzyme en une forme détectable (colorée ou fluorescente).

L'ELISA par compétition (Figure 17c) consiste à incuber l'échantillon contenant l'antigène avec une quantité connue d'anticorps spécifiques non marqués, puis avec l'antigène adsorbé sur une microplaque. Après lavage, l'ajout de l'anticorps secondaire puis du substrat entraîne l'apparition d'un signal dont l'intensité est inversement proportionnelle à la quantité d'antigènes initialement présents dans l'échantillon.



**Figure 17 : Principe de l'immunodosage ELISA indirect (a), en « sandwich » (b) et par compétition (c) (d'après [120])**

### III. 2. 1. 1. 2. RLAA (reporter-linked aptamer assay)

Les anticorps peuvent être substitués par les aptamères : le bioessai prend alors le nom d'ELONA [121] (enzyme-linked oligonucleotide assay) ou plus généralement RLAA [25] (reporter-linked aptamer assay). Différents formats peuvent être exploités, les aptamères étant utilisés comme molécules de capture ou reporteur, le plus souvent en association avec des anticorps.

Un premier essai en format « sandwich » a été développé pour la détection de la cytokine VEGF dans le sérum [122]. Un anticorps monoclonal spécifique du VEGF immobilisé est utilisé comme molécule de capture. L'échantillon est mis en présence d'un aptamère ARN anti-VEGF marqué par la fluorescéine, puis la détection est réalisée grâce à un anticorps anti-fluorescéine couplé à une enzyme. Les résultats obtenus sont similaires à ceux

observés pour les immunodosages ELISA classiques (limite de détection de 1 pM et absence de réactivité croisée vis-à-vis des autres cytokines), démontrant ainsi la possibilité de substituer les anticorps par des aptamères en bioanalyse.

Un bioessai compétitif a également été décrit pour la détection d'un colorant, le RG19 (reactive green 19) par suivi de l'émission de fluorescence d'un aptamère ADN marqué par le FITC (isothiocyanate de fluorescéine) incubé avec le RG19 immobilisé sur un gel [123]. Cette étude a montré que la conformation et l'affinité de l'aptamère n'étaient pas altérées par la conjugaison avec la fluorescéine, contrairement aux anticorps dont les performances peuvent être affectées suite à leur modification ou immobilisation.

Les aptamères peuvent en outre être exploités dans des formats que ne permettent pas les anticorps, tels que le déplacement [124]. Cet essai est basé sur la plus faible affinité de l'aptamère anti-thrombine pour la forme modifiée de la thrombine que pour la forme native ( $K_d$  inférieur d'un ordre de grandeur). L'aptamère est immobilisé sur une microplaque et la thrombine modifiée par conjugaison avec une enzyme est introduite. L'ajout de la cible (thrombine native) provoque alors un déplacement de la thrombine marquée qui s'accompagne d'une diminution de l'intensité du signal. Ce format est beaucoup plus délicat à exploiter avec les anticorps, du fait de la difficulté à obtenir une cible modifiée pour laquelle l'anticorps présente une affinité suffisante, mais inférieure à celle de la cible native de façon à permettre le déplacement.

L'utilisation de billes magnétiques dans les dosages RLAA a également été exploitée en mettant en œuvre des aptamères immobilisés ou marqués comme agents de capture ou de détection. Une stratégie a ainsi été développée pour la détection de différentes toxines (toxine du choléra et entérotoxine B du staphylocoque) [125]. Les aptamères ont d'abord été sélectionnés par conjugaison des toxines à des billes magnétiques tosylées, puis biotinylés et immobilisés sur des billes magnétiques recouvertes de streptavidine. Des essais exploitant différents formats ont permis de détecter les toxines avec des limites de détection (LOD) allant du nanogramme au picogramme.

La possibilité d'utiliser les aptamères dans des essais « sandwich » sensibles et robustes pour la détection de petites molécules (toxines, médicaments, hormones...) permet de surmonter les limitations du format compétitif et représente ainsi un avantage important par rapport aux anticorps [25].

### **III. 2. 1. 2. Détection par PCR d'affinité**

La détection d'acides nucléiques spécifiques par PCR est caractérisée par une sensibilité et une sélectivité que ne peuvent atteindre les méthodes actuelles de détection des protéines. La spécificité de l'amplification par PCR repose sur les amorces oligonucléotidiques qui s'hybrident aux séquences complémentaires de l'acide nucléique ciblé, qui est alors amplifié sélectivement. Cette technique permet donc de détecter des acides nucléiques particuliers dans une quantité minimale de matériel biologique, comme le broyat d'une seule cellule. Deux techniques basées sur la PCR d'affinité ont donc récemment été développées pour la détection ultrasensible de cibles peu abondantes.

La première stratégie repose sur la ligature de proximité (proximity ligation) de deux aptamères adjacents liés à la cible et a d'abord été appliquée à la détection de la thrombine et du facteur de croissance dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor, PDGF) [126]. Cette méthode nécessite la présence sur la cible protéique de deux sites d'interaction (épitopes) capables de se lier à deux aptamères (identiques ou différents) possédant chacun une extension oligonucléotidique. La liaison des aptamères à la cible entraîne un rapprochement des extensions, qui sont alors ligaturées grâce à un connecteur. Les séquences ligaturées sont ensuite amplifiées par PCR puis détectées sans qu'aucune étape de lavage ne soit nécessaire. Cette méthode ultrasensible (limite de détection de l'ordre du picomolaire pour la thrombine et du zeptomolaire pour le PDGF) offre également une sélectivité excellente grâce à la double reconnaissance des protéines.

Une seconde méthode se base sur la protection de l'aptamère vis-à-vis des exonucléases (exonuclease protection) conférée par la liaison avec la cible [127]. Les aptamères liés à la thrombine sont protégés de la dégradation par l'exonucléase I, tandis que les aptamères libres sont dégradés par cette enzyme. Après incubation avec l'exonucléase, les aptamères liés à la thrombine s'hybrident avec deux connecteurs qui sont ensuite ligaturés, formant ainsi un oligonucléotide plus long quantifié en temps réel par PCR quantitative fluorescente. La présence de protéines interférentes telles que la BSA (albumine sérique bovine) ou le facteur IX de la coagulation n'influe pas sur la détection jusqu'à 1 fM.

Récemment, la PCR d'affinité a été couplée à la CE pour la détection ultrasensible de traces de la RT du VIH-1 [128]. L'aptamère lié à la protéine est séparé de l'aptamère libre par CE, puis dissocié du complexe et amplifié par PCR. La limite de détection obtenue (180 molécules de protéine pour une injection de 10 nL) est inférieure d'un ordre de grandeur à celle des méthodes traditionnelles.

## III. 2. 2. Techniques séparatives

Les propriétés de reconnaissance moléculaire des aptamères en font également des outils de choix pour les techniques séparatives telles que la chromatographie et l'électrophorèse capillaire.

### III. 2. 2. 1. Chromatographie

La chromatographie est une technique de séparation mettant en jeu une phase mobile et une phase stationnaire. Suivant les interactions qu'ils développent avec chacune des phases, les composés introduits dans la colonne chromatographique sont plus ou moins retenus ce qui permet leur séparation. Lorsque ces interactions sont basées sur la reconnaissance moléculaire de l'analyte par la phase stationnaire, cette méthode prend le nom de chromatographie d'affinité. Les anticorps sont les ligands les plus utilisés (on parle alors de chromatographie d'immunoaffinité), mais leur efficacité est limitée par certaines contraintes : immobilisation non uniforme sur le support chromatographique, taille importante limitant la densité de greffage, dénaturation liée aux conditions d'élution [129]. Les aptamères, du fait de leur capacité de reconnaissance moléculaire spécifique, peuvent aussi être employés comme phase stationnaire en chromatographie d'affinité [32]. En outre, ils présentent de nombreux avantages par rapport aux anticorps : stabilité élevée, facilité de synthèse et de manipulation, taille plus petite permettant d'obtenir une meilleure couverture de surface. Ils ont ainsi été utilisés pour la séparation ou la purification de différents composés.

#### III. 2. 2. 1. 1. Séparation de petites molécules

Une phase stationnaire aptamère a ainsi été employée afin de séparer différents analogues de l'adénosine : AMP (adénosine monophosphate) cyclique, NAD<sup>+</sup> (nicotinamide adénine dinucléotide), AMP, ADP (adénosine diphosphate), ATP (adénosine triphosphate) et adénosine [130]. Après biotinylation en 3' via un espaceur carboné C<sub>15</sub>, l'aptamère est incubé avec des particules en polystyrène ou en verre recouvertes de streptavidine. La formation d'un pont streptavidine-biotine permet alors l'immobilisation des aptamères à la surface des particules avec une densité plus élevée que pour les anticorps (taux de couverture multiplié par 3 par rapport à l'immobilisation d'IgG). Ces particules fonctionnalisées sont ensuite introduites dans un capillaire en silice vierge, formant ainsi une colonne chromatographique d'affinité. L'optimisation des conditions de séparation a mis en évidence la forte influence de

la force ionique et de la concentration en  $Mg^{2+}$  de la phase mobile sur la rétention des composés. La constante de dissociation du complexe adénosine-aptamère, déterminée par chromatographie frontale, est similaire à la valeur précédemment rapportée en solution [74]. L'immobilisation de l'aptamère sur une surface n'altère donc pas son affinité.

### III. 2. 2. 1. 2. Séparation d'énantiomères

La chromatographie chirale est également une méthode de choix pour la séparation d'énantiomères. La résolution de mélanges racémiques présente un grand intérêt pharmaceutique et biologique, car il est fréquent que l'énantiomère d'un principe actif chirale soit inactif, voire toxique. A côté des sélecteurs chiraux classiquement employés (oligo- et polysaccharides, cyclodextrines, éthers couronnes, protéines, acides aminés, antibiotiques macrocycliques) se sont récemment développés des sélecteurs chiraux spécifiques d'une cible donnée, tels que les polymères à empreinte moléculaire (MIPs) [131] ou les anticorps [132]. Du fait de leur spécificité élevée, les aptamères présentent également des propriétés d'énantiosélectivité vis-à-vis des cibles chirales, et peuvent donc être utilisés comme sélecteurs chiraux spécifiques pour le développement de phases stationnaires chirales. L'immobilisation d'un aptamère ARN sélectionné contre la L-arginine sur une phase stationnaire conduit ainsi à une reconnaissance fortement énantiosélective de l'arginine, avec une rétention de l'énantiomère L environ 12 000 fois supérieure à celle de l'énantiomère D [78]. De même, un aptamère ADN biotinylé spécifique d'un D-peptide (arginine-vasopressine) a été immobilisé sur un support chromatographique [133]. L'influence de différents paramètres tels que la température, le pH et la concentration en sels sur la rétention des deux énantiomères a été étudiée, afin de permettre l'optimisation et la compréhension du mécanisme de discrimination. Une énantiosélectivité élevée a été observée dans les conditions optimisées, avec une forte rétention du D-peptide sur la colonne d'affinité et une élution du L-peptide dans le volume mort.

Cependant, un des inconvénients majeurs des aptamères est leur dégradation par les nucléases, particulièrement rapide pour les aptamères ARN. Une phase stationnaire chirale constituée d'un aptamère D-ARN dirigé contre la L-arginine soumise à des conditions chromatographiques habituelles d'utilisation et de stockage est ainsi très rapidement dégradée par les RNAses [134]. La stratégie des spiegelmers a donc été appliquée avec succès afin d'obtenir une phase stationnaire chirale L-ARN présentant une stabilité accrue (plus de 1500 volumes de colonne de phase mobile, soit environ 3 mois d'utilisation) et spécifique de l'énantiomère de la cible (D-arginine).

Paradoxalement, la spécificité très élevée des aptamères peut également être considérée comme un inconvénient, car les phases stationnaires chirales stationnaires obtenues ne peuvent résoudre qu'un seul racémate, ce qui leur confère un faible intérêt pratique. Des phases stationnaires chirales aptamères ont donc été développées pour la résolution de racémates de plusieurs composés analogues [135]. Les énantiomères de la tyrosine et de 10 analogues ont ainsi pu être séparés grâce à l'immobilisation d'un aptamère L-ARN dirigé contre la D-tyrosine.

### **III. 2. 2. 1. 3. Purification de protéines**

La chromatographie d'affinité est également souvent employée pour la purification de protéines. Un aptamère dirigé contre la L-sélectine humaine a ainsi été utilisé pour la purification de la protéine de fusion L-sélectine humaine - immunoglobuline G (LS-Ig) [136]. Après biotinylation en 5', l'aptamère a été immobilisé sur une résine modifiée par la streptavidine, puis introduit dans une colonne chromatographique. En une seule étape de purification, cette colonne d'affinité a conduit à un facteur de purification de 1500 et un rendement de 83%. Un contrôle négatif a également été réalisé, montrant que la LS-Ig purifiée n'était pas retenue sur une colonne préparée à partir d'une séquence brouillée (composition en bases conservée mais nucléotides arrangés dans un ordre différent).

Dans le cas de la purification des protéines dans leur forme native, l'utilisation des aptamères permet de s'affranchir du marquage d'affinité susceptible d'affecter la structure ou la fonction des protéines [23]. La purification du facteur de transcription thyroïdien (TTF1) a ainsi pu être réalisée [92]. Cette protéine, exprimée dans les cellules thyroïdiennes, pulmonaires et cérébrales des vertébrés, est un marqueur hautement spécifique de l'adénocarcinome pulmonaire primaire. Un aptamère sélectionné contre le TTF1 a été biotinylé puis attaché à des billes magnétiques recouvertes de streptavidine, afin de réaliser la chromatographie d'affinité d'un mélange complexe de protéines issu de lysats bactériens. Une purification très spécifique du TTF1 a alors pu être obtenue en une seule étape.

### **III. 2. 2. 2. Electrophorèse capillaire**

L'électrophorèse capillaire est également une technique de choix pour la détection/quantification de la cible ainsi que pour la détermination des paramètres cinétiques et thermodynamiques de l'interaction aptamère/cible.

La technique majoritairement employée est l'injection directe d'un mélange aptamère/cible pré-incubé. Cette méthode s'avère performante pour la quantification d'analytes formant un complexe de haute affinité avec le ligand, ce qui est le cas des aptamères. L'analyte est incubé avec le ligand, appelé sonde d'affinité, et la migration électrophorétique permet de séparer les espèces libres des espèces liées puis de les quantifier.

### III. 2. 2. 1. APCE (affinity probe capillary electrophoresis)

L'essai, appelé APCE (affinity probe capillary electrophoresis), peut être réalisé suivant deux formats distincts, compétitif ou non compétitif (direct), la mesure se basant respectivement sur les sites de liaison occupés ou laissés libres par l'analyte (Figure 18). Dans le format compétitif, la cible marquée (généralement par un fluorophore) est en compétition avec la cible non modifiée (l'analyte) pour lier une quantité limitée de ligand. Si la constante de formation du complexe ( $K_f$ ) est suffisamment élevée, le profil électrophorétique obtenu comporte deux pics distincts correspondant à la cible marquée libre et complexée avec le ligand, et permet la quantification de l'analyte, dont la concentration est inversement proportionnelle à celle de la cible marquée libre. Dans le format direct, une concentration constante de ligand marqué est incubée avec l'analyte. Le profil électrophorétique obtenu comporte deux pics distincts correspondant aux formes libre et complexée du ligand, et permet la quantification de l'analyte, dont la concentration est proportionnelle à celle du ligand complexé.

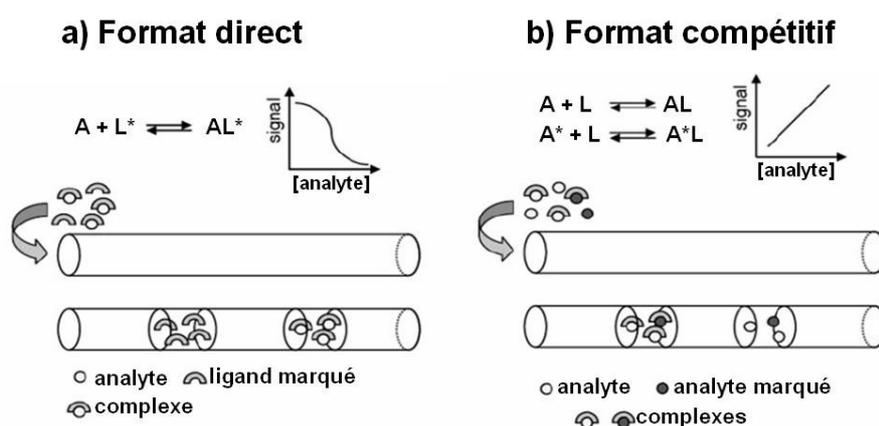


Figure 18 : Représentation schématique de l'APCE en format direct (a) et compétitif (b) [137]

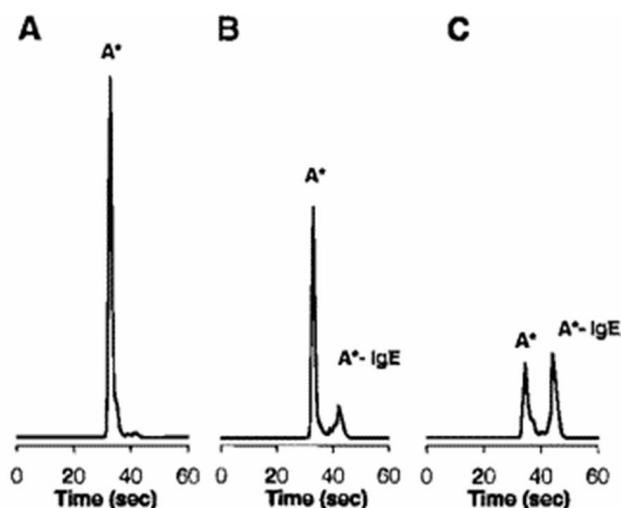
Le format direct présente plusieurs avantages par rapport au format compétitif, tels qu'une gamme dynamique plus étendue, une limite de détection dépendant moins de l'affinité entre l'analyte et le ligand et la capacité à discriminer les espèces présentant une réactivité croisée [138]. Cependant, l'approche non compétitive est difficilement applicable aux sondes

d'affinité les plus fréquemment employées que sont les anticorps. En effet, leur taille importante défavorise la séparation électrophorétique entre le complexe et l'anticorps libre, en particulier si l'analyte est une petite molécule. De plus, les anticorps présentent différents degrés de glycosylation, ce qui entraîne une hétérogénéité électrophorétique. Enfin, il est délicat de contrôler la position du marqueur fluorescent, qui peut perturber l'interaction s'il se trouve à proximité du site de liaison [138]. En revanche, les propriétés des aptamères en font des sondes d'affinité adaptées pour l'APCE en format direct [138]. En effet, ils possèdent des propriétés électrophorétiques prédictibles et une masse molaire relativement faible, ce qui permet de séparer plus efficacement le complexe de l'aptamère libre. De plus, le marquage fluorescent des aptamères est facilement réalisé, ce qui permet de les détecter de façon très sensible par fluorescence induite par laser (LIF). Les aptamères ont donc été principalement utilisés dans des approches directes pour la détection/quantification de protéines et la détermination de paramètres d'interaction.

L'aptamère anti-IgE est le premier à avoir été utilisé comme sonde d'affinité en APCE [138]. Un essai non compétitif a été développé pour le dosage de l'IgE dans des échantillons sériques à l'aide d'un aptamère ADN marqué par la fluorescéine. Après incubation, le mélange aptamère-cible est injecté hydrodynamiquement dans le capillaire, puis séparé par CE-LIF (Figure 19). Afin de limiter la dissociation du complexe pendant la migration électrophorétique, le temps d'analyse est réduit à 1 min grâce à l'application d'une dépression en sortie et à l'utilisation d'une longueur effective de 7 cm. Cette séparation rapide permet de détecter l'aptamère libre et complexé avec la cible. En utilisant la fluorescéine comme standard interne, l'IgE peut être détecté avec une gamme dynamique linéaire de  $10^5$  et une LOD de 46 pM. Aucune interférence n'est observée en présence d'IgG ou de matrices complexes telles que le sérum humain, démontrant la spécificité élevée de l'essai et son intérêt pour les applications cliniques. La détection de la thrombine a également pu être effectuée dans des conditions similaires [138].

En considérant les mêmes cibles, cette équipe a également évalué les effets de l'électrolyte, du champ électrique et de la durée de la séparation sur la détection des complexes aptamère-cible [139]. Les résultats montrent que la détection du complexe est favorisée par la diminution de la longueur effective du capillaire et du champ électrique appliqué. En effet, l'application d'un champ électrique élevé peut entraîner une détérioration du complexe, notamment par effet Joule, contrebalançant ainsi le gain en sensibilité obtenu grâce à la diminution du temps de séparation. A l'inverse, la suppression de l'écoulement

électroosmotique par modification de la paroi du capillaire ou ajout d'un suppresseur de flux dans l'électrolyte de séparation empêche la détection du complexe du fait de l'augmentation du temps de migration.

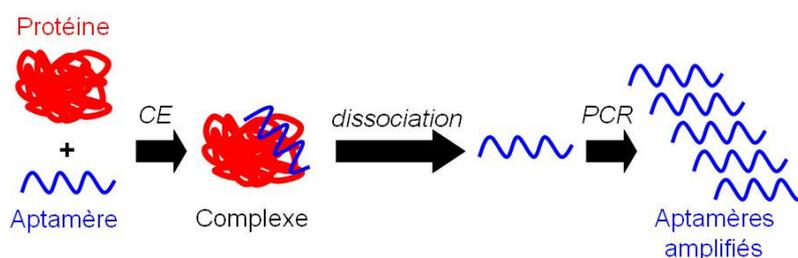


**Figure 19 : Dosage de l'IgE dans le sérum par APCE non compétitive à l'aide d'un aptamère ADN anti-IgE marqué par le FITC.** Les échantillons sont préparés dans du sérum humain reconstitué et contiennent une concentration finale de 300 nM d'aptamère (A\*) et 0 (A), 100 (B) ou 400 nM (C) d'IgE [138]

Un essai similaire a été développé pour le dosage direct par APCE de la RT du VIH-1 à l'aide d'un aptamère ADN spécifique marqué par la 5'-carboxyfluorescéine [140]. Le VIH-1 RT peut ainsi être quantifié jusqu'à 50 nM, sans réactivité croisée vis-à-vis d'autres RT ou du VIH-1 RT dénaturé. Cependant, l'analyse d'échantillons issus de milieux de culture cellulaire nécessite une dilution d'un facteur 100 au minimum, du fait de la présence d'interactions non spécifiques. Par la suite, la sensibilité de l'essai a pu être améliorée d'un facteur 70 à 120 grâce à l'introduction d'une procédure de focalisation par ADN [141]. Cette stratégie consiste à établir des conditions électrophorétiques telles que la mobilité du complexe ADN-protéine soit comprise entre celle des co-ions présents dans l'échantillon et dans l'électrolyte de séparation (principe de l'isotachophorèse). Pour cela, des anions de mobilité supérieure et inférieure à celle de l'ADN sont utilisés pour l'échantillon et pour l'électrolyte de séparation, respectivement. Ce procédé de focalisation permet d'accroître l'efficacité de la séparation, la sensibilité et la rapidité de l'analyse. En outre, il peut être réalisé dans des conditions physiologiques (force ionique élevée), ce qui est souvent nécessaire pour préserver les interactions des protéines. D'autres méthodes de préconcentration telles que la focalisation par gradient de température (TGF) ou l'injection continue de l'échantillon par amplification du champ électrique (FACSI) ont également été employées afin d'améliorer la sensibilité et la reproductibilité de la détection [142].

D'autre part, la stoechiométrie de l'interaction entre le VIH-1 RT et quatre aptamères ADN a été étudiée par APCE couplée à une détection par polarisation de fluorescence induite par laser (LIFP) [143]. Pour trois de ces aptamères, deux stoechiométries (1:1 et 1:2) sont observées, suggérant une liaison avec deux sous-unités de la protéine (p66 et p51). Les complexes 1:2 présentent une polarisation de fluorescence plus faible que les complexes 1:1, malgré leur taille plus importante. Ce phénomène résulte probablement d'un transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) entre les deux molécules fluorescentes liées à la cible. La quantification de la protéine a ensuite été réalisée à l'aide de l'aptamère le plus affin. Des courbes de calibration basées sur la combinaison des aires de pic des complexes 1:1 et 1:2 ou sur l'aire du pic de l'aptamère libre conduisent à une gamme linéaire comprise entre 0 et 35 nM.

Enfin, la CE a été couplée à la PCR d'affinité pour la détection ultrasensible de traces de la RT du VIH-1 [128]. L'aptamère lié à la protéine est séparé de l'aptamère libre par CE, puis amplifié par PCR après dissociation du complexe (Figure 20). Cette approche permet d'améliorer considérablement la sensibilité de la méthode, puisque 180 molécules de protéine (30 fM) ont pu être détectées.

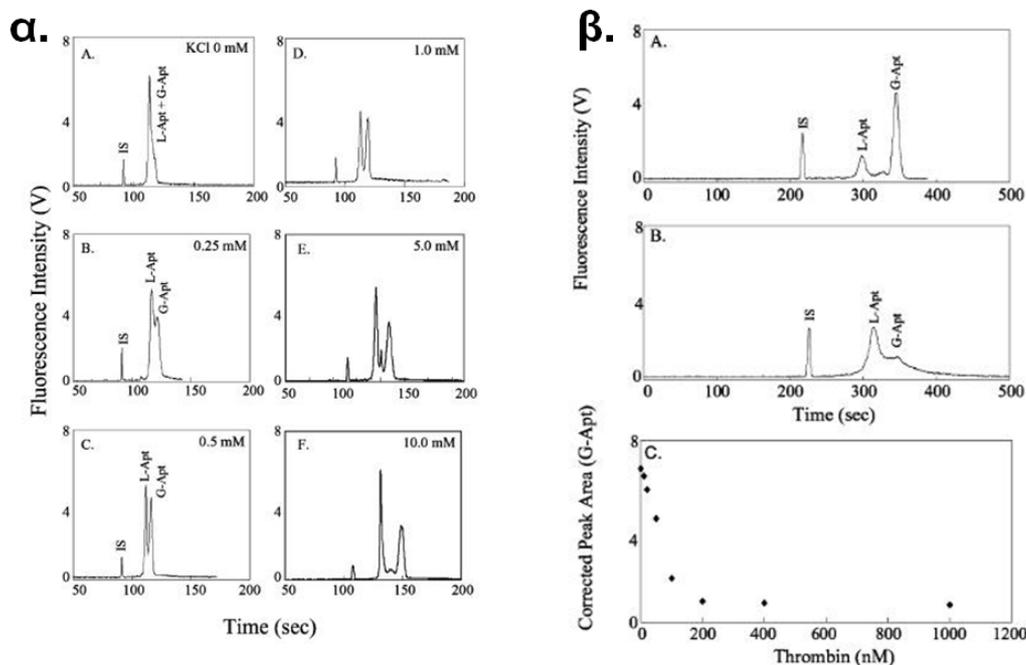


**Figure 20 : Principe du couplage de la CE à la PCR d'affinité pour la détection ultrasensible de protéines** (d'après [128])

Des essais ont également été développés à l'aide d'un aptamère anti-thrombine avec un détecteur LIF [138,139]. Cependant, l'aptamère 15-mer utilisé possède une affinité moins élevée pour sa cible que les aptamères dirigés contre l'IgE ou le VIH-1 RT ( $K_d \sim 200$  nM contre  $\sim 10$  nM et 1-2 nM respectivement), ce qui entraîne une dissociation importante du complexe lors de la séparation électrophorétique, résultant en une LOD élevée (40 nM).

Une solution à ce problème consiste à augmenter la longueur effective du capillaire (25 cm) afin d'éviter les interférences entre l'aptamère libre marqué et le complexe [144]. Dans ce cas, le complexe se dissocie quasi-totalement durant l'analyse, et la détection se base uniquement sur les variations du pic de l'aptamère libre. En présence d'ions  $K^+$  et  $Ba^{2+}$ , les profils électrophorétiques font apparaître deux pics correspondant à deux conformations

distinctes adoptées par l'aptamère anti-thrombine : une conformation linéaire (L-aptamère) et une structure en tétrade de G (G-aptamère) (Figure 21 $\alpha$ ). Seul le G-aptamère est capable de se complexer avec la thrombine, ce qui confirme l'importance de la conformation de l'aptamère dans l'interaction avec sa cible (Figure 21 $\beta$ ).



**Figure 21 $\alpha$  : Séparation des formes linéaire et G-quartet de l'aptamère anti-thrombine 15-mer en présence de  $K^+$ [144].** Electrolyte de séparation : Tris 25mM, glycine 192 mM et KCl 0 (A), 0,25 (B), 0,5 (C), 1,0 (D), 5,0 (E) et 10,0 mM (F), pH 8,4. Echantillon : aptamère anti-thrombine 200 nM et fluorescéine (standard interne) 10 mM dans le BGE. Injection hydrodynamique ( $\Delta h = 5$  cm) : 5 s. Champ électrique appliqué : 285 V/cm. Capillaire : longueur totale 35 cm, longueur effective 10 cm.

**Figure 21 $\beta$  : Quantification de la thrombine par APCE-LIF à l'aide de l'aptamère anti-thrombine [144].** Electrophérogrammes obtenus pour 200 nM d'aptamère incubé avec 0 (A) ou 200 nM de thrombine (B) et courbe de calibration de la thrombine (C). Electrolyte de séparation : Tris-HCl 10 mM et KCl 15 mM, pH 8,4. Echantillons : aptamère 200 nM, fluorescéine 10 mM (standard interne) et thrombine 0-1,0  $\mu$ M dans le BGE. Injection hydrodynamique ( $\Delta h = 10$  cm) : 10 s. Champ électrique appliqué : 350 V/cm. Capillaire : longueur totale 50 cm, longueur effective 25 cm.

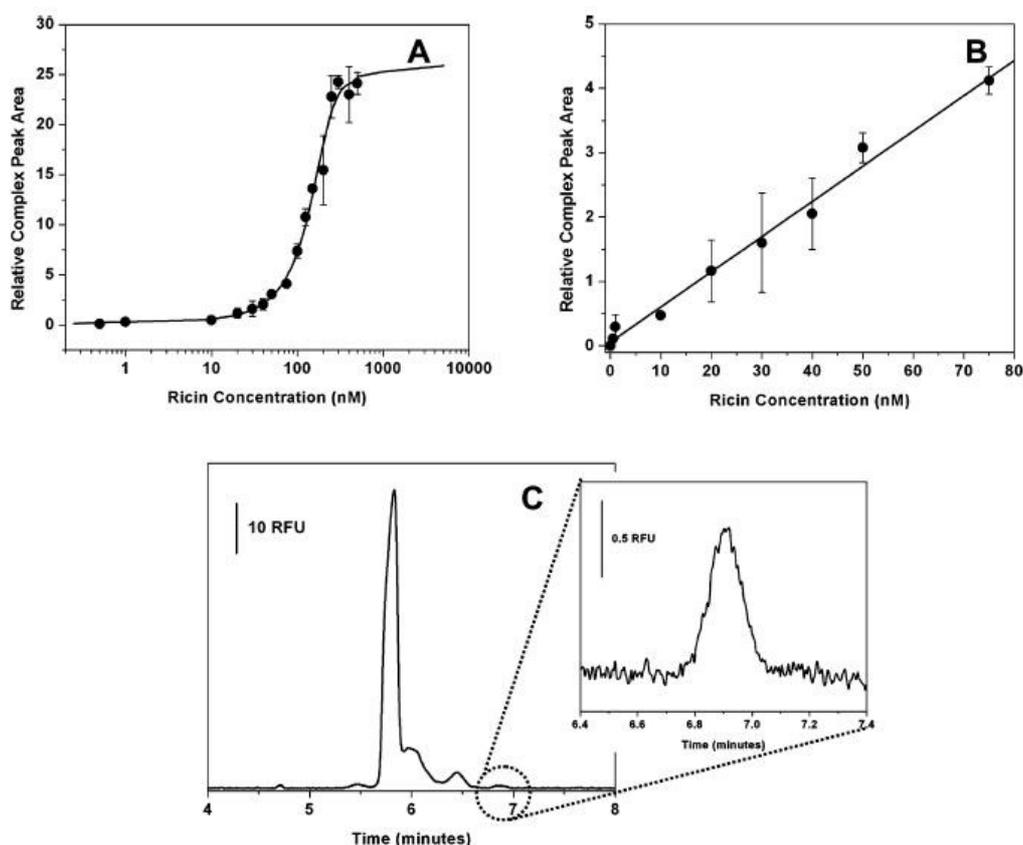
L'affinité plus élevée du G-aptamère pour la thrombine permet d'améliorer la sensibilité de l'essai d'un facteur quatre (LOD de 9,8 nM). Une autre approche développée en parallèle consiste à stabiliser le complexe aptamère-thrombine par ajout d'un polymère linéaire soluble (PEG) dans l'électrolyte de séparation [144]. En effet, ce type de polymère est connu pour favoriser un « effet de cage » stabilisant qui ralentit la dissociation des complexes et augmente localement la concentration des analytes. En utilisant un capillaire court (longueur effective 5 cm) modifié par le PVP, l'addition de 2% de PEG permet ainsi de détecter le complexe, et d'obtenir une sensibilité identique à la stratégie précédente (LOD de 10 nM). Une approche compétitive a également permis d'adapter cet essai au suivi en temps réel et à la quantification de l'interaction entre la thrombine et l'antithrombine III [144].

Récemment, la sensibilité du dosage de la thrombine par APCE-LIF a pu être encore améliorée grâce à l'utilisation d'un aptamère anti-thrombine 29-mer présentant une affinité plus élevée ( $K_d = 0,5 \text{ nM}$ ) que l'aptamère 15-mer habituellement employé [145]. L'aptamère libre et le complexe sont ainsi correctement séparés, et une LOD de 2 nM a ainsi pu être atteinte après optimisation des conditions de séparation. La différence d'affinité entre les aptamères 15-mer et 29-mer peut s'expliquer par leur site de liaison sur la thrombine : le 15-mer se lie à l'exosite 1, alors que le 29-mer semble interagir avec l'exosite 2, plus électropositif. D'autre part, les deux aptamères ne possèdent pas la même structure tridimensionnelle : tous deux présentent une structure quadruplexe, mais le 29-mer possède un motif duplexe supplémentaire, constitué par l'hybridation de 4 paires de bases complémentaires. De plus, la structure quadruplexe du 29-mer est observée en présence de thrombine, et ce même en l'absence de cation ( $K^+$ ) contrairement au 15-mer.

Des aptamères anti-thrombine 29-mer (TA29) et 35-mer (TA35) marqués par la tétraméthyl rhodamine (TMR) ont également été employés pour la détection et la quantification de la thrombine humaine par APCE-LIFP [146]. Les deux aptamères présentent une spécificité élevée vis-à-vis de la thrombine en l'absence de cations métalliques stabilisants ( $K_d$  de 21,9 et 14,3 nM pour le TA29 et le TA35, respectivement), l'ajout de ces derniers défavorisant même légèrement la formation du complexe. L'aptamère le plus affiné (TA35) a été employé pour le développement d'un dosage hautement sensible de la thrombine humaine dans le sérum humain, présentant une limite de détection de 55,6 pM et une gamme dynamique de 0,25 – 10 nM.

L'APCE-LIF a également été employé comme nouvelle approche pour la détection de la ricine à des concentrations sub-nanomolaires à l'aide d'un aptamère ARN [147] (Figure 22). La formation du complexe aptamère-ricine a d'abord été optimisée en fonction de différents paramètres. En effet, la présence du cation divalent  $Mg^{2+}$  dans l'échantillon est nécessaire à la formation du complexe. D'autre part, la modification covalente de la paroi du capillaire par un polymère neutre, le poly(diméthylacrylamide) (PDMA) permet de réduire l'adsorption non-spécifique des protéines sur la paroi ainsi que le flux électroosmotique. De plus, l'ajout de glycérol dans l'échantillon apporte une stabilisation supplémentaire du complexe et augmente la viscosité de la matrice, ce qui contribue à la suppression de l'écoulement électroosmotique et améliore ainsi l'efficacité de l'injection électrocinétique. Enfin, la force ionique de l'électrolyte de séparation est augmentée afin d'introduire un effet de péconcentration par amplification du champ électrique (field-amplified sample stacking,

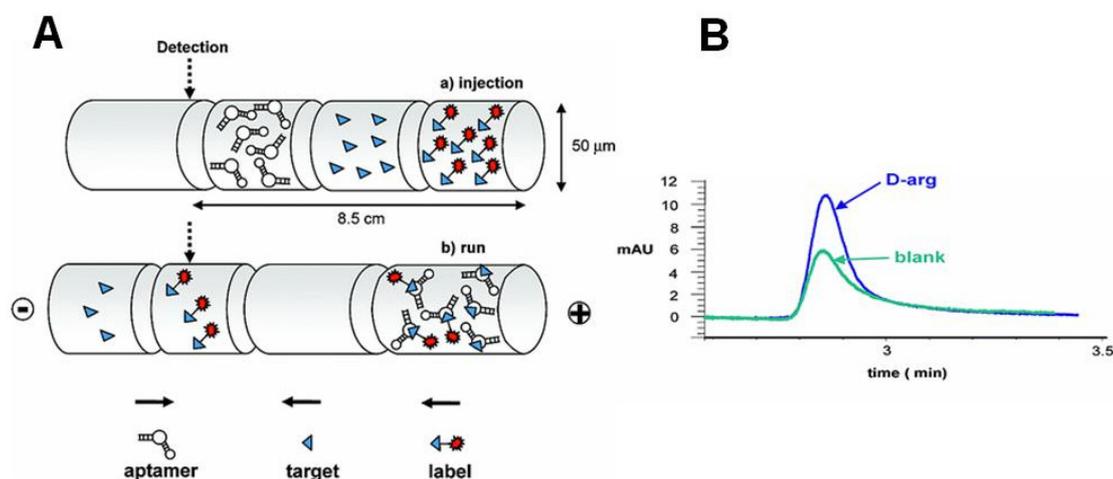
FASS) permettant de rendre le pic du complexe gaussien. Dans des conditions hors équilibre, un  $K_d$  de 134 nM est observé, soit une valeur environ 20 fois supérieure à celle précédemment rapportée pour cet aptamère (7,3 nM [93]). Plusieurs facteurs peuvent en effet influencer l'interaction entre l'aptamère et sa cible : nature du tampon employé, présence du marqueur fluorescent, dissociation du complexe due à la durée de l'analyse et à l'application d'un champ électrique, équilibre non atteint. L'injection séquentielle de l'aptamère et de la ricine permet d'effectuer le mélange directement dans le capillaire, limitant ainsi la dissociation du complexe par rapport au mélange pré-incubé. Cet essai non compétitif permet de détecter la ricine jusqu'à 500 pM (7,1 amol) en présence de protéines interférentes telles que la BSA ou la caséine, et jusqu'à 1 nM en présence de RNase malgré une dégradation importante de l'aptamère. Cette approche pourrait donc être performante pour la détection sensible, sélective et rapide d'agents de guerre biochimiques.



**Figure 22 : Détection de la ricine par APCE-LIF à l'aide d'un aptamère ARN [147].** Influence de la concentration en ricine sur l'aire du pic du complexe (A et B) : une constante de dissociation de  $133,8 \pm 8,2$  nM (A) et une gamme linéaire de 500 pM-75 nM (B) sont observées. Profil montrant la détection de 500 pM de ricine (C).

Capillaire : 30 cm x 50  $\mu$ m i. d. (longueur effective 20 cm) modifié par le poly(diméthyl acrylamide)(PDMA). Electrolyte de séparation : tétraborate 125 mM (pH 8,5). Echantillon : aptamère 1 nM, ricine. Matrice : tétraborate 33 mM (pH 8,5),  $MgCl_2$  5 mM, glycérol 5 %. Injection électrocinétique : 15 s, 8 kV, polarité inverse. Tension de séparation : 8 kV, polarité inverse.

Un essai compétitif a été décrit pour la détection UV d'impuretés énantiomères à l'aide d'un aptamère L-ARN (spiegelmer) présentant une affinité élevée pour la D-arginine [148,149]. Le mélange est effectué à l'intérieur du capillaire grâce à l'injection séquentielle de trois zones : (i) une zone contenant une quantité connue d'aptamère, (ii) une zone contenant une quantité inconnue de D-arginine et (iii) une zone contenant une quantité connue de D-arginine marquée par le dansyle [148] (Figure 23). Cette méthode rapide (<5 min) permet de détecter jusqu'à 0,01% d'énantiomère minoritaire dans un mélange non racémique, une valeur inférieure d'un ordre de grandeur aux LOD atteintes grâce aux méthodes d'analyse stéréosélective actuelles (RMN ou techniques de séparation conventionnelles). Le développement d'une approche « hybride » combinant la pré-incubation de l'aptamère avec l'échantillon contenant l'arginine et le mélange en capillaire pour la compétition avec la cible marquée a permis d'améliorer la sensibilité de l'essai [149].



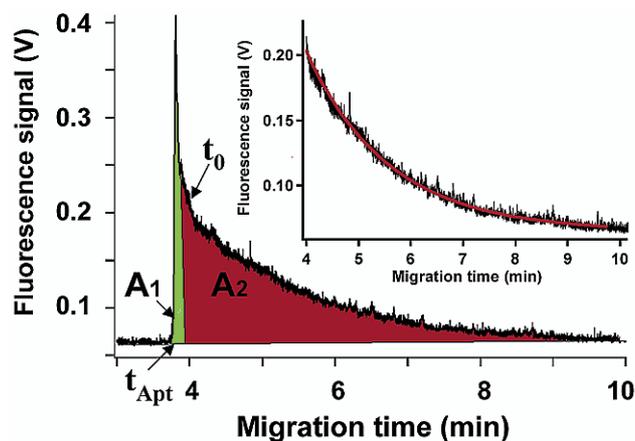
**Figure 23 : Principe de la détection d'impuretés énantiomères par APCE en format compétitif.** Mélange des différentes espèces à l'intérieur du capillaire (A) et électrophérogrammes montrant le pic de cible marquée obtenu sans et avec 10 µM de D-arginine dans l'échantillon (B) [148]

Une stratégie sans marquage a été développée pour la détection de l'hémine et de l'ADN par chimiluminescence [150]. Dans le tampon phosphate à pH 11, l'hémine catalyse l'oxydation du luminol, générant ainsi une chimiluminescence (CL) importante. La molécule-cible se comporte donc comme un indicateur direct de l'interaction aptamère-protéine : lorsque le complexe est séparé par CE en présence de luminol, une diminution du signal de l'hémine libre est observée. De plus, l'hémine présente une affinité élevée ( $K_d \sim 73$  nM) pour les structures en tétrade de G ce qui permet de l'utiliser pour la détection de l'ADN. Deux aptamères ADN riches en guanine ont été utilisés respectivement comme élément de reconnaissance et comme ADN cible. En présence d'ions  $K^+$ , ces aptamères adoptent une structure en tétrade de G, qui permet à l'hémine d'interagir avec le complexe formé. Lorsque

l'hémine et l'aptamère anti-hémine sont en excès, la diminution du signal de CL de l'hémine libre observée dépend majoritairement de la concentration en ADN cible, qui peut alors être détecté avec une sensibilité élevée (LOD 0,1  $\mu\text{M}$ ).

### III. 2. 2. 2. NECEEM

Une autre approche basée sur l'électrophorèse capillaire hors équilibre de mélanges en équilibre (NECEEM) a été développée pour l'analyse quantitative de protéines à l'aide d'aptamères formant des complexes peu stables avec leur cible [151]. De manière générale, la NECEEM d'une protéine et de son aptamère marqué par un fluorophore génère en détection par fluorescence des électrophérogrammes comportant trois éléments caractéristiques : deux pics correspondant à l'aptamère libre et au complexe aptamère-protéine, et une traînée exponentielle attribuée à l'aptamère provenant de la dissociation du complexe durant la séparation (Figure 24). L'analyse de ces trois éléments permet de déterminer les paramètres de l'interaction ( $K_d$  et  $k_{off}$ ) à partir d'une seule expérience, ainsi que la concentration en protéine.



**Figure 24 :** Electrophérogramme généré par la NECEEM du mélange de la thrombine et de l'aptamère anti-thrombine [151]. L'aire sous le pic,  $A_1$ , correspond à l'aptamère libre ; l'aire sous la courbe exponentielle,  $A_2$ , correspond à la dissociation du complexe durant la séparation. L'encart illustre l'ajustement des données expérimentales avec la fonction exponentielle pour la détermination du  $k_{off}$ .

Capillaire en silice vierge 33 cm x 20  $\mu\text{m}$  i. d. (longueur effective 33 cm). Tampon d'incubation : Tris-HCl 20 mM, KCl 5 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM (pH 8,3). Injection hydrodynamique (1 s, 9,1 kPa). Electrolyte de séparation : borax 25 mM, ADN simple brin 200 nM (pH 9,4). Champ électrique appliqué : 400 V/cm (polarité positive). Détection : LIF.

Le  $K_d$  est déterminé à partir du pic correspondant à l'aptamère libre et de la partie exponentielle correspondant à la fraction du complexe aptamère-protéine en équilibre. La fraction d'aptamère libre en équilibre  $[\text{Apt}]_{\text{éq}}$  est proportionnelle à l'aire brute du pic,  $A_1$  (Equation 7) :

$$[\text{Apt}]_{\text{éq}} = c_1 A_1 \quad (7)$$

où  $c$  est une constante. La fraction de complexe en équilibre  $[C]_{\text{éq}}$  est proportionnelle à l'aire sous la courbe exponentielle,  $A_2$  (Equation 8) :

$$[C]_{\text{éq}} = c_2 A_2 \quad (8)$$

Si le rendement de fluorescence est identique pour l'aptamère libre et le complexe aptamère-protéine ( $c_1 = c_2$ ), la même constante  $c$  peut être utilisée dans les deux expressions précédentes. Le rapport  $R$  des deux fractions en équilibre est donc (Equation 9) :

$$R = \frac{[Apt]_{\text{éq}}}{[C]_{\text{éq}}} = \frac{A_1}{A_2} \quad (9)$$

Connaissant la concentration en protéine introduite dans le mélange, le  $K_d$  peut alors être déterminé à l'aide de l'expression suivante (Equation 10) :

$$K_d = \frac{[P]_0(1+R) - [Apt]_0}{1 + \frac{1}{R}} \quad (10)$$

où  $[P]_0$  et  $[Apt]_0$  sont les concentrations initiales en protéine et en aptamère dans le mélange incubé.

La vitesse de dissociation du complexe  $k_{\text{off}}$  peut également être déterminée à partir de la partie exponentielle de l'électrophérogramme par ajustement des données expérimentales avec la fonction suivante (Equation 11) :

$$I_t = I_B + I_{t_0} \exp\left\{-k_{\text{off}} \frac{t_C}{t_C - t_{\text{Apt}}} (t - t_0)\right\} \quad (11)$$

avec  $I_t$  et  $I_{t_0}$  les intensités de fluorescence au temps  $t$  et  $t_0$  respectivement,  $I_B$  l'intensité de fluorescence du bruit de fond et  $t_{\text{Apt}}$  et  $t_C$  les temps de migration de l'aptamère et du complexe respectivement.

Une fois le  $K_d$  du complexe déterminé, la quantification de la protéine peut alors être réalisée en utilisant l'expression analytique suivante (Equation 12) :

$$[P]_0 = \frac{K_d}{R} + \frac{[Apt]_0}{1+R} \quad (12)$$

La valeur du  $K_d$  étant sensible à la composition et au pH du tampon d'incubation dans lequel le mélange en équilibre est préparé, l'analyse quantitative d'une protéine par NECEEM doit inclure trois étapes : (i) l'optimisation des tampons d'incubation et de séparation, (ii) la détermination du  $K_d$  dans le tampon d'incubation optimal et (iii) la détermination de la concentration en aptamère  $[Apt]_0$  appropriée pour la gamme dynamique des concentrations en protéine étudiées.

Cette stratégie a été appliquée à l'analyse de la thrombine à l'aide d'un aptamère spécifique marqué indirectement via une séquence additionnelle associée à un oligonucléotide complémentaire marqué par la fluorescéine (FDNA) [151]. Cette approche permet d'utiliser le même FDNA pour le marquage d'aptamères différents. De l'ADN simple brin est ajouté dans l'électrolyte de séparation afin de lier l'aptamère libre de façon non spécifique, empêchant ainsi la formation du complexe durant l'analyse. Le complexe se dissociant totalement durant l'analyse, les électrophérogrammes obtenus comportent seulement le pic de l'aptamère libre et la courbe exponentielle associée à la dissociation du complexe. A partir de plusieurs expériences impliquant différentes concentrations en aptamère et en thrombine dans le mélange, un  $K_d$  de  $240 \pm 16$  nM a été déterminé. Cette valeur est deux fois plus faible que celle obtenue précédemment par APCE (450 nM) [138], ce qui peut s'expliquer par la prise en compte de la dissociation du complexe durant l'analyse ou par l'utilisation d'un tampon d'incubation différent. Un  $k_{off}$  de  $(8,8 \pm 1,0) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  a également été obtenu, entraînant la dissociation de la quasi-totalité du complexe durant l'analyse ( $t_c=9,4$  min). Cette méthode permet de détecter la thrombine jusqu'à 60 nM, ce qui est comparable aux LOD obtenues en maintenant l'équilibre.

Cette approche a été étendue à l'étude de l'influence de la température (15 à 55°C) sur les paramètres de l'interaction ( $K_b$ ,  $k_{off}$  et  $k_{on}$ ) entre la Taq polymérase et un aptamère ADN [152]. La courbe  $K_b(T)$  présente une transition abrupte à 36°C, sans doute liée à un changement de conformation de l'aptamère. L'analyse de la variation des constantes de vitesses avec l'augmentation de la température indique que la dissociation et la formation du complexe sont affectées par ces changements structuraux.

### ***III. 2. 2. 3. Electrochromatographie***

L'électrochromatographie (CEC) ou chromatographie électrocinétique est une méthode de séparation combinant les principes de la chromatographie (présence d'une phase stationnaire) et de l'électrophorèse capillaire (application d'un champ électrique). Le temps de rétention des composés dépendant à la fois de leur mobilité électrophorétique et des interactions mises en jeu avec chacune des phases, il est ainsi possible de séparer des espèces neutres ou chargées. Les aptamères ont été utilisés pour le développement de nouvelles phases stationnaires en CEC. Un aptamère ARN dirigé contre la flavine mononucléotide (FMN) et immobilisé de façon covalente sur la paroi interne d'un capillaire en silice vierge a été évalué

en CEC en tube ouvert pour la rétention de la FMN et de la flavine adénine dinucléotide (FAD) [153].

Des phases stationnaires élaborées à partir d'oligonucléotides ADN adoptant une structure en tétrade de G ont également été utilisées pour la séparation de composés non ciblés. Dans cette approche différente, la discrimination entre les composés ne repose plus sur la spécificité des aptamères mais sur les interactions faibles, non spécifiques, développées avec les oligonucléotides immobilisés.

L'aptamère anti-thrombine, présentant une tétrade de G à deux plans, ainsi qu'une séquence analogue de plus grande stabilité formant une tétrade de G à quatre plans ont été employés pour séparer plusieurs protéines non ciblées en CEC à tube ouvert (Figure 3). Une phase stationnaire obtenue par immobilisation covalente de la structure à quatre plans a permis de séparer les variants A et B de la  $\beta$ -lactoglobuline bovine (LgA et LgB), qui ne diffèrent que par deux acides aminés [154]. Aucune séparation n'a été observée avec un oligonucléotide de même composition mais n'adoptant pas de structure en tétrade de G, ce qui suggère que cette structure est impliquée dans la discrimination entre les protéines. Cette approche a été appliquée à la séparation de plusieurs protéines lactées bovines ( $\alpha$ -caséine,  $\beta$ -caséine,  $\kappa$ -caséine,  $\alpha$ -lactalbumine and  $\beta$ -lactoglobuline) et une évaluation des structures à deux et quatre plans a été effectuée [15]. La structure à deux plans ne permet pas une séparation complète des caséines, alors que la structure à quatre plans présente une bonne résolution pour ces protéines. Les auteurs ont attribué cette différence à une perte de structure en l'absence de cation stabilisant pour l'oligonucléotide le moins stable [15]. En effet, en présence de 1 mM de  $K^+$ , la structure à deux plans permet de séparer des albumines d'espèces différentes ou des variants d'une même albumine avec une résolution supérieure à celle obtenue avec la structure à quatre plans [155]. La structure à deux plans, moins rigide que la structure à quatre plans, semble ainsi offrir une flexibilité accrue qui pourrait faciliter l'interaction avec les protéines.

Cette approche s'est également montrée adaptée à la séparation de petites molécules non ciblées. Une phase stationnaire à tétrade de G à deux plans a été utilisée afin de séparer par CEC en tube ouvert de petits analytes non ciblés tels que les acides aminés et les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAPs) [156]. Les HAPs étant peu solubles dans l'eau, une phase mobile hydro-organique a été employée. Comme pour la séparation de protéines, le rôle de la conformation en tétrade de G dans la séparation des HAPs a pu être mis en évidence. En effet, l'ajout de KCl dans la phase mobile entraîne une séparation partielle du naphthalène et du benzo-pérylène, non résolus en son absence. Des phases

stationnaires à tétrades de G à deux ou quatre plans ont en outre été évaluées pour la séparation de deux dipeptides isomères (Trp-Arg et Arg-Trp) [157]. Des études en température ont montré que la résolution pouvait être améliorée par une déstabilisation partielle de la tétrade de G, bien que le rôle de cette structure dans la séparation ait été confirmé. Les effets de la déstabilisation de la structure en tétrade de G ont été analysés plus précisément par l'étude de l'influence de la température et de la concentration en cation sur la résolution de quatre peptides dérivés du fibrinogène [158].

### III. 2. 3. Biocapteurs et bioessais

Un biocapteur est un dispositif permettant la détection d'un analyte d'intérêt via une réaction biologique [159]. Il est constitué d'un élément de reconnaissance moléculaire (récepteur) associé à un transducteur : l'élément de reconnaissance moléculaire réagit spécifiquement avec l'analyte, tandis que le transducteur (optique, électrochimique, acoustique) convertit le phénomène de reconnaissance moléculaire en un signal (lumineux, électrique, fréquence) permettant une mesure quantitative ou semi-quantitative (Figure 25). L'élément de reconnaissance moléculaire et le transducteur sont intégrés dans un seul dispositif, petit et portable, permettant de doser l'analyte d'intérêt sans ajout d'autres réactifs ni prétraitement de l'échantillon. Les biocapteurs se distinguent en cela des systèmes bioanalytiques, qui nécessitent des étapes additionnelles telles que l'ajout de réactifs [160]. En outre, contrairement aux biosondes, les biocapteurs sont réutilisables et permettent un suivi continu de la concentration de l'analyte [160].

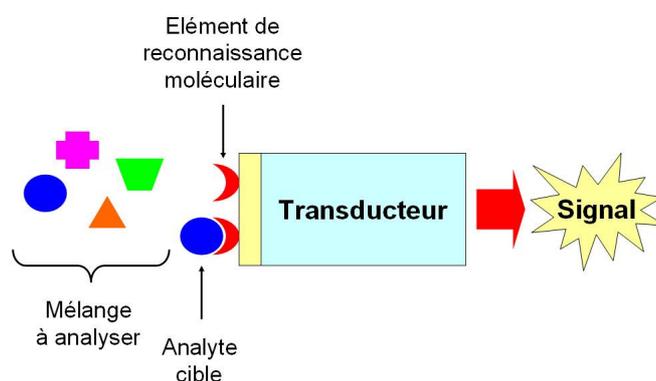


Figure 25 : Principe d'un biocapteur

La performance d'un biocapteur dépend de la spécificité et de l'affinité de l'élément de reconnaissance moléculaire vis-à-vis de l'analyte [159]. Diverses molécules biologiques ont été utilisées comme élément de reconnaissance : enzymes, antigènes, anticorps, micro-

organismes, cellules [161]. Du fait de leurs propriétés d'affinité et de spécificité, les aptamères peuvent également être employés comme éléments de reconnaissance moléculaire pour l'élaboration de biocapteurs : on parle alors d'aptasenseurs [121]. Par rapport aux biocapteurs utilisant des anticorps (immunocapteurs), les aptasenseurs présentent de nombreux avantages. En effet, la petite taille des aptamères permettent une immobilisation efficace et la formation de monocouches de densité élevée, deux paramètres d'importance cruciale lors de l'élaboration de systèmes miniaturisés tels que les biocapteurs [25]. En outre, ils peuvent être facilement marqués sans modification de leurs propriétés [121], ce qui autorise différentes méthodes de détection. Enfin, les aptamères peuvent être soumis à des cycles répétés de dénaturation et de régénération sans perte d'efficacité [121], ce qui permet d'obtenir des biocapteurs réutilisables.

Les différents aptasenseurs développés peuvent être classés selon la méthode de transduction employée.

### ***III. 2. 3. 1. Aptasenseurs optiques***

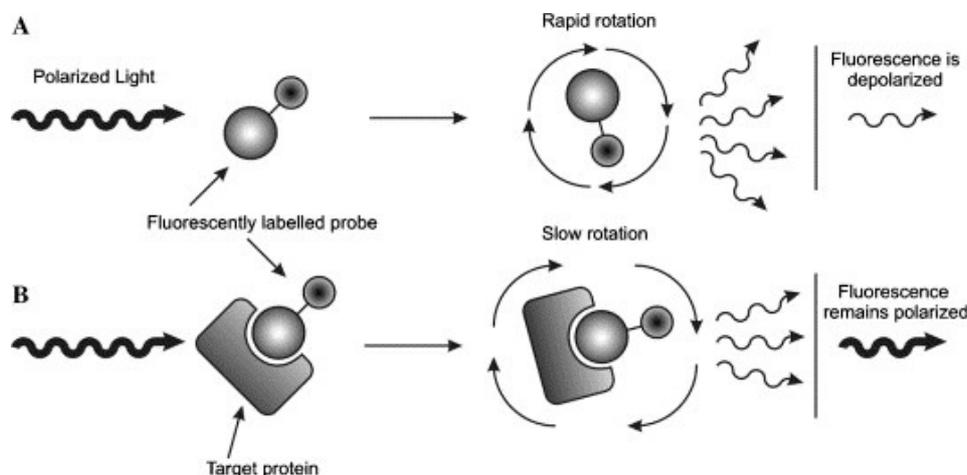
Les méthodes de transduction optique utilisent des aptamères marqués (émission de fluorescence) ou non marqués (résonance plasmonique de surface).

#### **III. 2. 3. 1. 1. Méthodes basées sur l'émission de fluorescence**

Les méthodes de transduction basées sur l'émission de fluorescence consistent généralement à immobiliser l'aptamère sur un support solide et à détecter l'interaction avec sa cible en temps réel via un marquage par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) [159].

Une première approche utilisant un format non-compétitif consiste à immobiliser l'aptamère marqué par la fluorescéine sur un support en verre. L'excitation par une onde évanescente polarisée induit une anisotropie de fluorescence qui dépend de la vitesse de diffusion rotationnelle de l'aptamère, elle-même fonction de la taille de ce dernier. Le passage d'une solution contenant la molécule cible entraîne la formation d'un complexe avec l'aptamère, ce qui modifie son anisotropie de fluorescence (Figure 26). Le suivi des variations de l'anisotropie de fluorescence de l'aptamère marqué permet donc de quantifier la cible. Il est à noter que les anticorps sont incompatibles avec une telle approche : en effet, leur taille élevée implique une vitesse de diffusion rotationnelle faible en solution, et par conséquent une

variation non significative lors de l'interaction avec la cible [25]. Les immunoessais utilisant la polarisation de fluorescence ne peuvent donc être réalisés qu'en format compétitif.



**Figure 26 : Différence d'anisotropie de fluorescence entre l'aptamère (A) et le complexe aptamère-cible (B) [162].** La rotation rapide de l'aptamère, de petite taille, entraîne une dépolarisation de la fluorescence, tandis que la rotation lente du complexe maintient la polarisation.

Cette approche a été utilisée pour le développement d'un aptasenseur permettant la détection de la thrombine [163]. Spécifique, rapide (10 minutes), sensible (limite de détection de 0,7 amol soit  $0,7 \times 10^{-18}$  mol pour un volume d'échantillon de 140 pL) et présentant une gamme dynamique 1000 fois plus élevée que les valeurs précédemment décrites, ce capteur peut en outre être facilement régénéré par ajout d'un agent dénaturant entraînant la dissociation du complexe aptamère-thrombine.

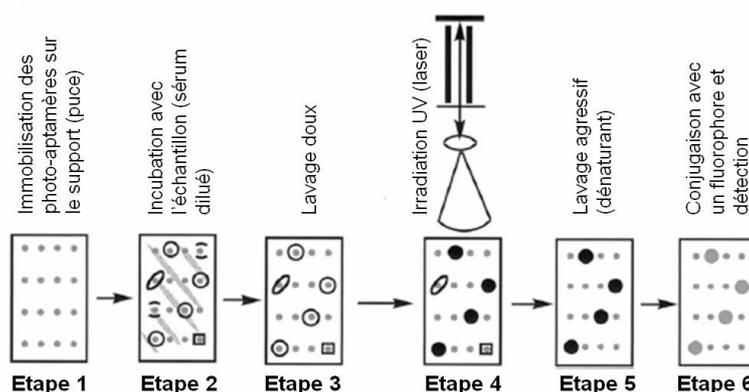
Plusieurs équipes ont proposé d'utiliser les aptamères comme moyen de criblage à haut débit de protéines dont l'expression est liée à l'apparition de pathologies, permettant d'émettre un diagnostic rapide et précis. Un autre aptasenseur a ainsi été développé sur le même principe pour l'analyse simultanée de multiples protéines dans des échantillons biologiques complexes [164]. La détection spécifique et la quantification de plusieurs protéines impliquées dans le cancer (inosine monophosphate déshydrogénase IMPDH, facteur de croissance vasculaire endothélial VEGF, facteur de croissance des fibroblastes basique bFGF) a ainsi pu être réalisée dans des extraits cellulaires ainsi que dans le sérum humain. Cette technique pourrait ainsi permettre un diagnostic plus rapide du cancer.

Une autre approche utilisant le format compétitif consiste à incuber l'aptamère non marqué avec un analogue marqué de la cible. La cible non marquée peut alors être détectée grâce à la variation de la fluorescence induite par compétition avec la cible marquée. Un autre exemple d'aptasenseur optique pour la détection de la thrombine a ainsi été développé sur ce

principe [165]. Après immobilisation de l'aptamère à leur surface, des micro-sphères de silice sont dispersées dans des micro-puits situés à l'extrémité de fibres optiques puis incubées avec une solution de thrombine marquée par la fluorescéine. Ce système permet de détecter la thrombine non marquée de façon sélective, sensible (limite de détection de 1 nM), réutilisable et rapide (15 minutes temps de régénération inclus). Il est ainsi envisageable d'utiliser des micro-plaques à aptamères de ce type pour la détection simultanée d'analytes multiples.

Une variante consiste à détecter directement la cible non marquée grâce à un anticorps traceur marqué par un fluorophore, en réalisant un essai dans un format « sandwich ». L'aptamère immobilisé joue le rôle d'agent de capture, et la cible liée à l'aptamère interagit avec l'anticorps traceur, aboutissant à la formation d'un complexe « sandwich » aptamère-cible-anticorps. Cette approche a été utilisée pour la détection de la ricine sur des puces à aptamères [166]. L'aptamère anti-ricine biotinylé est immobilisé sur des billes d'agarose recouverte de streptavidine, puis mis en contact avec la solution contenant la ricine et l'anticorps anti-ricine marqué. Une limite de détection de 320 ng/mL a été atteinte grâce à ce procédé, et des contrôles négatifs ont mis en évidence une spécificité élevée. L'éluion de la protéine liée par une solution d'urée concentrée permet également de régénérer le capteur.

Un système de diagnostic utilisant des aptamères sélectionnés par photo-SELEX a été développé pour la détection simultanée d'un grand nombre de protéines [61]. Les différentes étapes de ce procédé sont schématisées sur la Figure 27.



**Figure 27 : Les différentes étapes du système de diagnostic utilisant des photo-aptamères pour la détection simultanée de protéines [61]**

Des photo-aptamères spécifiques de multiples marqueurs protéiques sont immobilisés sur un support solide (étape 1) et incubés avec l'échantillon (étape 2). Après un premier lavage doux destiné à éliminer les ligands de faible affinité (étape 3), la puce est soumise à un rayonnement UV (étape 4), ce qui entraîne la formation d'une liaison covalente photo-induite

entre l'aptamère et sa cible. Le remplacement des liaisons faibles du complexe aptamère-cible par une liaison covalente permet de réaliser des lavages beaucoup plus stringents (étape 5) afin d'éviter les faux positifs dus à des interactions non spécifiques et d'améliorer le rapport signal/bruit. Un fluorophore spécifique des acides aminés est ensuite ajouté afin de détecter quantitativement les protéines liées (étape 6). Cette méthode permet ainsi, à partir d'un minimum d'échantillon, de réaliser le criblage à haut débit de multiples protéines avec une spécificité très élevée.

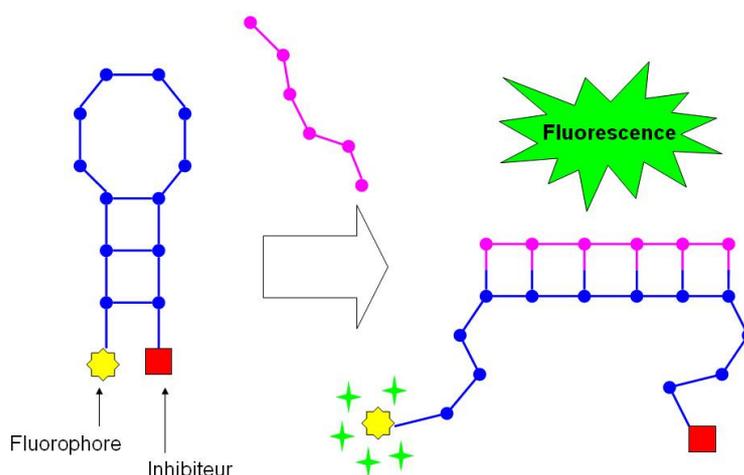
### III. 2. 3. 1. 2. Aptamères signaux

L'interaction entre l'aptamère et sa cible s'accompagne très souvent d'un changement de structure de l'oligonucléotide. Le concept d'aptamère signal (signaling aptamer) consiste à associer un signal à ce changement conformationnel afin de permettre la détection en temps réel du ligand, et éventuellement son dosage. Ce type d'aptamère présente notamment un intérêt pour le développement d'essais en phase homogène ne nécessitant pas d'étapes d'immobilisation et de lavage [167]. Plusieurs stratégies ont été développées afin de transformer les aptamères en « aptamères signaux », la plupart basées sur l'émission de fluorescence [23].

Une première stratégie consiste à introduire un fluorophore dans les régions subissant les changements structuraux, de manière à ce que la liaison de l'aptamère à sa cible induise un changement d'intensité de fluorescence [167]. Deux aptamères anti-adénosine, l'un en série ARN et l'autre en série ADN, ont été modifiés avec différents fluorophores situés à des positions variées par rapport au site de liaison de la cible. Après optimisation de ces deux paramètres, deux aptamères signaux ont été obtenus, permettant la détection sélective et quantitative de l'adénosine en solution grâce à l'augmentation de l'intensité de fluorescence induite par la formation du complexe.

Une autre stratégie repose sur le concept de balise moléculaire (molecular beacon), dont le principe de fonctionnement est représenté Figure 28. Les balises moléculaires sont des sondes oligonucléotidiques permettant de détecter la présence d'acides nucléiques spécifiques en solution [168] via un changement conformationnel qui se traduit par une modification de leurs propriétés de fluorescence. Ces oligonucléotides sont constituées d'une séquence complémentaire de la cible (sonde) encadrée par deux séquences complémentaires entre elles [169], ainsi que d'un fluorophore et d'un inhibiteur de fluorescence (quencher) attachés de façon covalente à chaque extrémité. En l'absence de la cible, la balise adopte une structure

tige-boucle du fait de l'hybridation de ses extrémités complémentaires ; le fluorophore et l'inhibiteur sont alors à proximité, ce qui empêche l'émission de fluorescence par le fluorophore par transfert d'énergie vers l'inhibiteur. En présence de la cible, la sonde interagit avec celle-ci pour former un complexe plus stable que la structure tige-boucle. Le changement de conformation résultant éloigne le fluorophore et l'inhibiteur, permettant l'émission de fluorescence par le fluorophore.



**Figure 28 : Principe de fonctionnement d'une balise moléculaire**

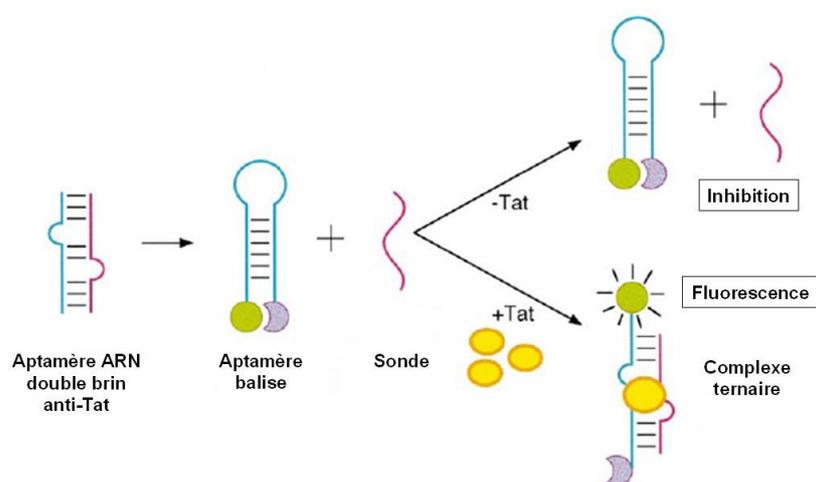
Le concept d'aptamère balise (aptamer beacon, ou aptabeacon) combine le mécanisme de transduction du signal des balises moléculaires avec les propriétés de reconnaissance moléculaire des aptamères, permettant ainsi la détection de cibles non nucléiques telles que les protéines [170].

Une première stratégie consiste à conjuguer l'aptamère à deux additifs : un fluorophore et un inhibiteur de fluorescence. L'éloignement des deux composés permet une émission de fluorescence, leur rapprochement l'interdit. Si le réarrangement structural consécutif à l'association/dissociation de l'aptamère et de la cible provoque une variation de la distance entre fluorophore et inhibiteur, la détection de la cible est alors possible par mesure de l'intensité de fluorescence. La difficulté réside dans l'introduction post-SELEX des deux additifs à des positions sensibles au changement conformationnel sans altérer les propriétés de reconnaissance de l'aptamère [3].

Un aptamère anti-thrombine a ainsi été modifié par ajout en 5' de nucléotides complémentaires de l'extrémité 3', afin d'adopter une structure en double brin qui juxtapose une molécule fluorescente et son inhibiteur, empêchant ainsi l'émission de fluorescence [171]. En présence de thrombine, l'aptamère se lie à celle-ci en adoptant une structure en

tétrade de G, ce qui rompt la structure double brin et entraîne l'émission d'un signal fluorescent proportionnel à la quantité de thrombine présente.

Sur ce même modèle, un aptamère balise a également été développé pour la détection de la protéine Tat du VIH [169]. Pour cela, un aptamère ARN double brin a été séparé en deux oligomères ADN, l'un jouant le rôle de sonde et le second, partiellement complémentaire, formant une structure tige-boucle comportant un fluorophore (fluorescéine) et un inhibiteur (acide 4(4'-diméthylamino-phénylazo) benzoïque) aux extrémités 5' et 3', respectivement. En présence de Tat, les deux oligomères s'hybrident pour interagir avec la protéine, ce qui permet la séparation du couple fluorophore-inhibiteur, aboutissant ainsi à une augmentation significative de la fluorescence (Figure 29).

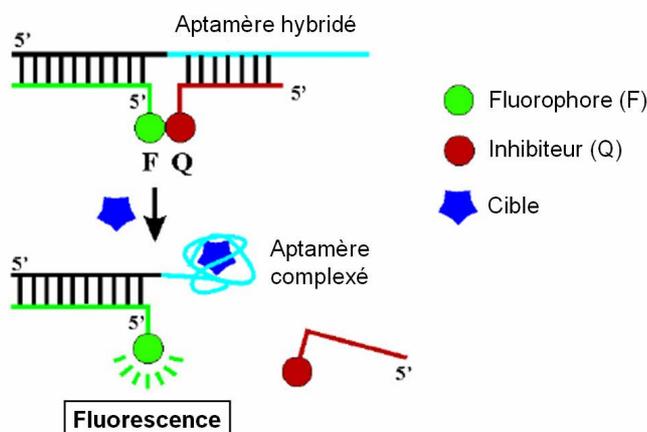


**Figure 29 : Représentation schématique du fonctionnement de l'aptamère balise pour l'analyse de la protéine virale Tat [169]**

Cette stratégie a également été appliquée à la détection de petites molécules telles que la cocaïne [172]. L'aptamère anti-cocaïne interagit avec sa cible via une poche d'interaction formée par une jonction trois voies (intersection de trois tiges). Cette structure a été modifiée afin de former une tige unique dont les extrémités ont été marquées par un fluorophore et un inhibiteur. En l'absence de cocaïne, ces extrémités sont éloignées ce qui entraîne l'émission de fluorescence. L'ajout de cocaïne permet de former la poche d'interaction (jonction trois voies), ce qui rapproche le couple fluorophore-inhibiteur et entraîne ainsi une inhibition de la fluorescence. Le capteur réalisé permet de quantifier la cocaïne et ses métabolites dans des milieux complexes tels que le sérum.

Une variante consiste à utiliser un aptamère marqué par un fluorophore et une petite séquence oligonucléotidique complémentaire attachée à un inhibiteur [173] (Figure 30). En l'absence de la cible, l'aptamère s'hybride avec l'oligonucléotide complémentaire,

rapprochant le fluorophore et l'inhibiteur : la fluorescence est alors minimale. En présence de la cible, la formation du complexe aptamère-cible est favorisée, la séquence complémentaire est alors libérée ce qui entraîne une augmentation de l'intensité de fluorescence.



**Figure 30 : Principe de fonctionnement d'un aptamère balise constitué d'un aptamère marqué par un fluorophore et une petite séquence oligonucléotidique complémentaire attachée à un inhibiteur [173]**

Une alternative à cette stratégie consiste à utiliser un transfert d'énergie entre molécules fluorescentes, appelé transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET). Il s'agit d'un transfert d'énergie non radiatif résultant d'une interaction dipôle-dipôle entre deux fluorophores, l'un donneur et l'autre accepteur d'énergie, situés à une distance suffisamment faible (< 10 nm).

Cette approche a été utilisée pour suivre la cinétique d'hybridation d'oligonucléotides sur des microparticules [174]. Un oligonucléotide marqué par la biotine en 5' et par la fluorescéine en 3' est immobilisé sur des microparticules de latex recouvertes de streptavidine. L'hybridation avec un oligonucléotide complémentaire marqué par la tétraméthylrhodamine (TMR) en 5' s'accompagne d'un transfert d'énergie de la fluorescéine vers la TMR, qui conduit à une émission de fluorescence par la TMR et à l'inhibition de l'émission de la fluorescéine.

Un bioessai utilisant un aptamère marqué à ses deux extrémités par un couple de fluorophores accepteur-donneur a permis de détecter 10 nanogrammes de PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes) par microgramme de protéines sériques issues d'un milieu de culture cellulaire, démontrant ainsi l'efficacité de cette méthode en milieu biologique [175].

Le FRET peut également être utilisé pour étudier la dynamique conformationnelle de l'aptamère en présence ou non de sa cible. Des changements conformationnels de l'aptamère

anti-VEGF (facteur de croissance endothéliale vasculaire) en présence de  $Mg^{2+}$  et du VEGF ont ainsi pu être mis en évidence [176].

Cependant, malgré les efforts fournis pour optimiser le double marquage des oligonucléotides, peu de progrès ont été réalisés concernant la quantification. Ceci est probablement lié à la multiplicité des facteurs influençant l'efficacité du FRET, comme la nature des fluorophores, la longueur de l'espaceur ou les interactions entre fluorophores [177]. En outre, l'application de cette technique à l'analyse directe des analytes dans des échantillons biologiques complexes est délicate, du fait de la présence d'un bruit de fond qui tend à diminuer la sensibilité et la sélectivité de l'essai. Ce bruit de fond provient majoritairement de l'inhibition incomplète de la balise moléculaire et de la fluorescence naturelle de l'environnement biologique dans lequel se trouve la protéine cible. Une solution à ce problème, consistant à marquer l'aptamère par un pyrène à chaque extrémité, a donc été développée pour la détection du PGDF [178]. La complexation de l'aptamère avec la cible rapproche les deux pyrènes qui forment alors un excimère (dimère dans un état excité), entraînant une augmentation de la longueur d'onde d'émission de fluorescence (de 400 à 485 nm) ainsi que du temps de vie (de 5 à 40 ns environ) (Figure 31). Le signal induit par l'interaction de l'aptamère avec sa cible peut donc être aisément distingué du bruit de fond biologique, ce qui autorise la détection directe ainsi que la quantification de molécules dans des milieux complexes sans purification préalable de l'échantillon.

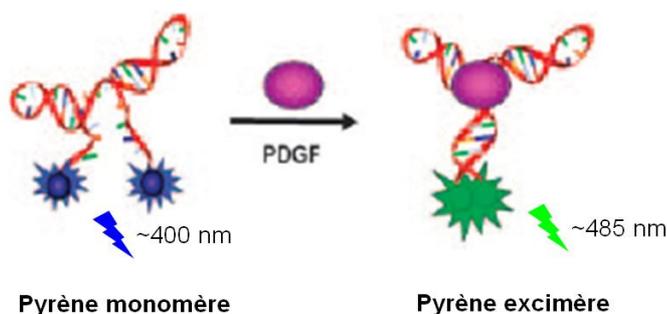
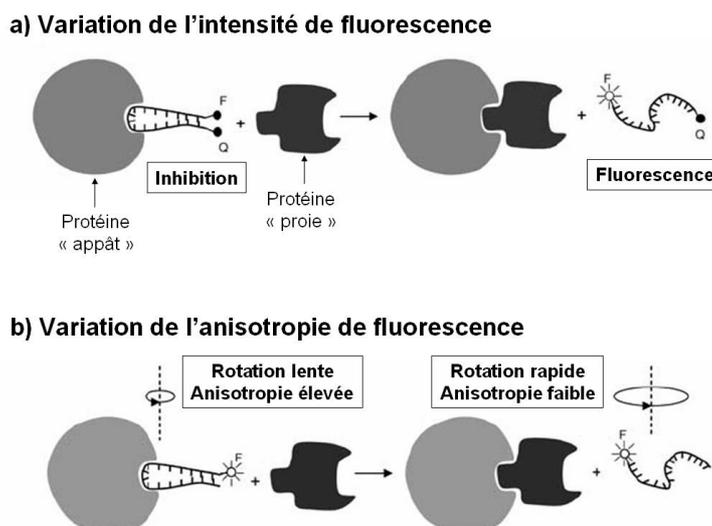


Figure 31 : Détection du PGDF par formation d'un excimère du pyrène [178]

Les aptamères balises sont également un outil intéressant pour l'étude en temps réel des interactions entre protéines, ce qui permet notamment de s'affranchir du marquage des protéines, susceptible de perturber l'interaction [179]. Une stratégie consiste à introduire une compétition entre un aptamère de l'une des protéines et la seconde protéine. Deux méthodes de transduction, le FRET et l'anisotropie de fluorescence, ont ainsi été développées afin d'étudier les interactions entre l' $\alpha$ -thrombine humaine (protéine « appât ») et différentes protéines (protéines « proies ») à l'aide de deux aptamères spécifiques des deux sites de

liaison de l' $\alpha$ -thrombine [179] (Figure 32). Dans le premier cas, l'aptamère est marqué à ses extrémités par deux fluorophores de façon à ce que la liaison avec la protéine appât induise une conformation propice à un FRET interne, entraînant ainsi une extinction de fluorescence. L'interaction de l'appât avec la proie libère l'aptamère, qui subit alors un changement structural aboutissant à la restauration de la fluorescence. La deuxième méthode consiste à marquer l'aptamère par un fluorophore unique et à suivre l'anisotropie de fluorescence, qui varie lorsque l'aptamère interagit avec la cible protéique.



**Figure 32 : Etude des interactions protéine-protéine à l'aide d'un aptamère balise par suivi des variations de l'intensité (a) ou de l'anisotropie (b) de fluorescence [179]**

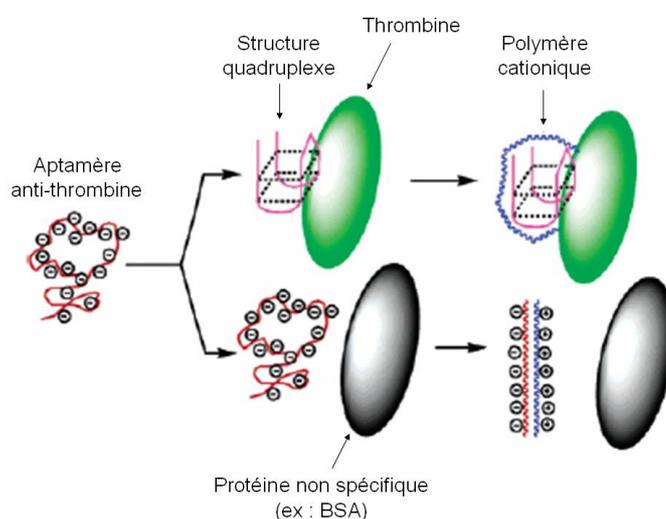
De nombreux efforts ont été fournis pour développer des méthodes alternatives permettant de s'affranchir du marquage des aptamères. En effet, il est souvent délicat d'optimiser les stratégies de marquage, du fait des incertitudes sur les sites de liaison de la cible et les changements de conformation. De plus, le marquage des aptamères en série ARN, qui représentent la majeure partie des aptamères sélectionnés, est particulièrement ardu du fait de l'instabilité de l'ARN [23].

Un capteur colorimétrique a ainsi été développé pour la détection de la cocaïne [180]. Après incubation de l'aptamère avec un colorant (l'iodure de diéthylthiotricarbocyanine), l'ajout de la cocaïne entraîne la dissociation du complexe aptamère-colorant qui s'accompagne d'une atténuation de l'absorbance à 760 nm, proportionnelle à la concentration en cocaïne introduite dans une gamme allant de 2 à 600  $\mu$ M. La sensibilité et la sélectivité de ce capteur colorimétrique sont légèrement meilleures que celles obtenues pour un capteur fluorescent réalisé par la même équipe [172].

Une autre approche est basée sur l'utilisation d'un complexe du ruthénium ( $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ ) pour détecter l'interaction aptamère-protéine en phase homogène [181].

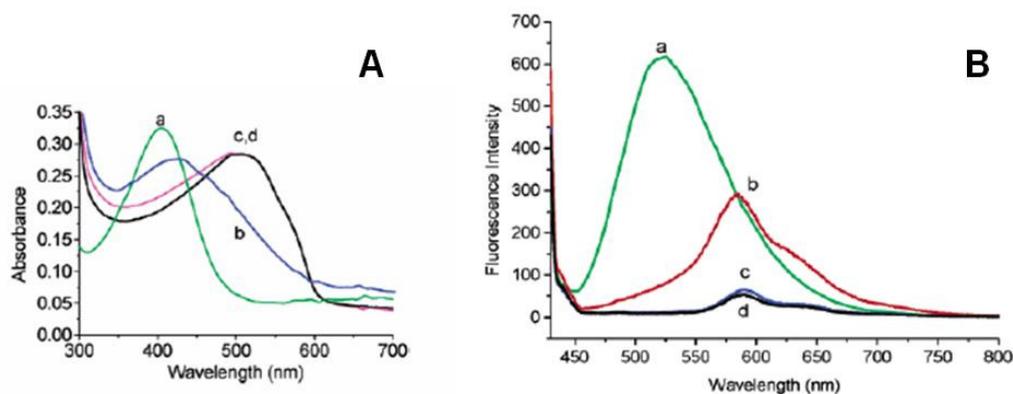
Ce complexe présente une émission lumineuse intense lorsqu'il se lie à l'ADN double brin. En outre, il possède une affinité élevée ( $K_d \sim 10^{-6}$  M) pour les duplexes d'acides nucléiques et est capable de s'intercaler au sein de la structure repliée des aptamères. La liaison de l'aptamère avec sa cible induit un changement structural qui se traduit par un changement de luminescence protéine-dépendant. Cette stratégie, testée pour trois aptamères dirigés contre l'IgE, le PGDF (facteur de croissance dérivé des plaquettes) et la thrombine, a permis de quantifier les protéines cibles avec une sélectivité et une sensibilité élevées (LOD allant de 10 pM pour la thrombine à 1 nM pour le PGDF).

Enfin, une méthode basée sur la formation d'un complexe hybride aptamère-polymère a permis la détection de la thrombine avec une sensibilité femtomolaire [182] (Figure 33).



**Figure 33 : Description schématique de la détection spécifique de la thrombine à l'aide de l'aptamère anti-thrombine et d'un polymère cationique [182]**

Le changement conformationnel de l'aptamère chargé négativement est détecté grâce à un polymère cationique soluble dans l'eau et photoactif dérivé du polythiophène, qui transduit spécifiquement la formation du complexe en un signal optique (colorimétrique ou fluorimétrique) (Figure 34). Le polymère cationique semble enlacer la structure quadruplexe de l'aptamère, formant un complexe 1:1:1 entre le polymère, l'aptamère et la thrombine de couleur orange et possédant un spectre UV-visible caractéristique. En l'absence du complexe aptamère-cible, une coloration rouge violacée est observée, caractéristique de la structure du polythiophène en présence d'ADN simple brin déplié.



**Figure 34 : Spectre d'absorption UV-visible (A) et de fluorescence (B) enregistrés dans l'eau à 5°C du polymère seul (a), du complexe ternaire thrombine/aptamère/polymère (b), d'un mélange thrombine-aptamère non spécifique (c) et d'un mélange protéine non spécifique (BSA)-aptamère (d) [182]**

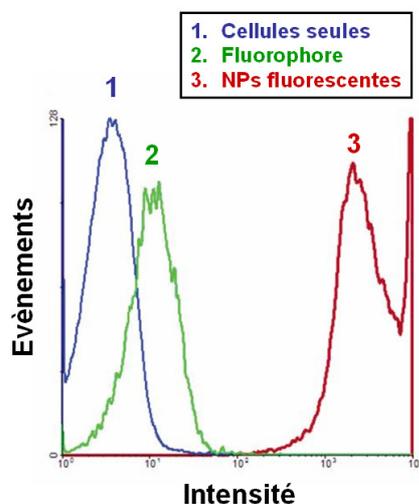
### III. 2. 3. 1. 3. Nanoparticules fonctionnalisées

La fonctionnalisation par des aptamères de nanoparticules (NPs) et de points quantiques (quantum dots, QDs) permet de s'affranchir de certaines des difficultés liées à l'utilisation de marqueurs fluorophores organiques, telles qu'un spectre d'excitation restreint, un temps de vie de fluorescence court et un faible rendement quantique [31].

L'emploi simultané de nanoparticules magnétiques et fluorescentes a ainsi été appliqué à la collection et la détection de cellules cancéreuses [183]. Placées dans un champ magnétique, des nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques fonctionnalisées par des aptamères réalisent l'extraction des cellules-cibles, tandis que des nanoparticules de silice modifiées par un fluorophore et fonctionnalisées par des aptamères permettent la détection des cellules. La combinaison de ces deux types de nanoparticules permet une détection rapide, sensible et sélective de la cible. L'utilisation de nanoparticules fluorescentes permet d'amplifier le signal (100 fois par rapport au fluorophore seul) et d'améliorer ainsi la sensibilité par rapport aux méthodes basées sur le marquage individuel de l'aptamère (Figure 35). Des essais menés sur des échantillons de sang total ont démontré le potentiel de cette technique pour le diagnostic clinique.

Des aptamères ont également été immobilisés sur des nanoparticules d'or afin d'amplifier la détection par spectroscopie d'absorbance de la thrombine en solution et sur des surfaces [184]. Ce procédé montre une sélectivité élevée vis-à-vis de la thrombine en présence de BSA et d'IgG humaine, avec une limite de détection d'environ 2 nM et une gamme dynamique linéaire comprise entre 50 et 120 nM. Du fait de la présence de plusieurs dizaines d'aptamères sur chaque nanoparticule, l'interaction avec la thrombine entraîne une agglomération des nanoparticules d'or sous forme d'un précipité. Les nanoparticules agrégées

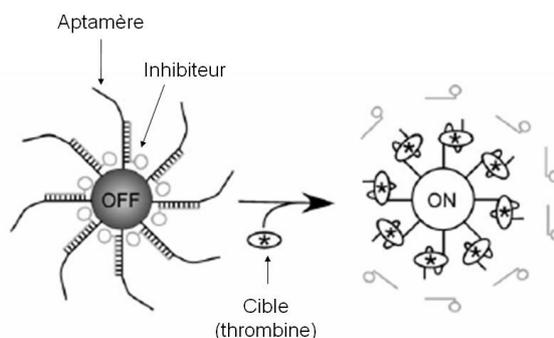
sont alors isolées par centrifugation, stabilisées dans une solution contenant un surfactant puis amplifiées par croissance catalytique. Un phénomène d'agrégation similaire a été utilisé pour la détection colorimétrique de plusieurs isoformes du PDGF [185].



**Figure 35 : Comparaison de la détection de cellules par cytométrie de flux à l'aide d'un fluorophore ou de NPs fluorescentes [183]**

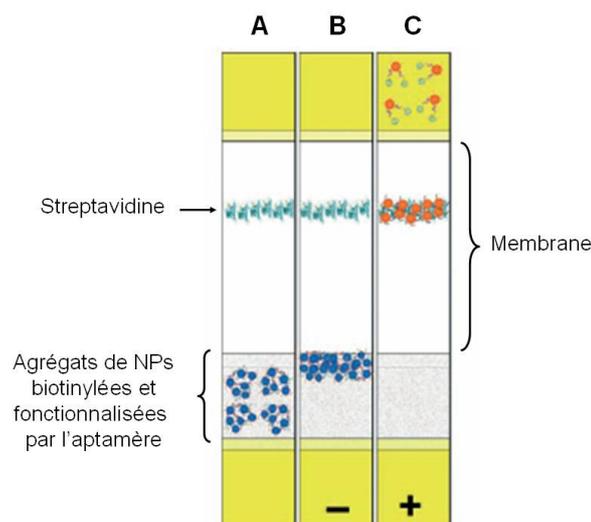
La détection ultrasensible de cytokines a également été réalisée dans un format « sandwich » grâce à l'utilisation simultanée de nanoparticules d'or fonctionnalisées par l'aptamère et du même aptamère biotinylé [186]. L'absorbance générée par le complexe aptamère-protéine est amplifiée et détectée par un lecteur de microplaque, permettant ainsi d'obtenir une limite de détection de 83 aM et une gamme dynamique linéaire allant de 1 fM à 100 pM, ce qui représente une amélioration par rapport à un immunodosage ELISA classique.

Une autre approche basée sur les points quantiques a été décrite pour l'élaboration d'un biocapteur spécifique de la thrombine [187]. Dans cette approche similaire à celle des balises moléculaires, des couples aptamère/inhibiteur sont liés aux QDs, qui sont donc initialement dans l'état « off » (extinction de fluorescence). L'interaction avec la thrombine modifie la conformation de l'aptamère, ce qui déstabilise et libère l'inhibiteur, faisant ainsi passer le QD dans l'état « on » (émission de fluorescence) (Figure 36).



**Figure 36 : Détection de la thrombine à l'aide d'un point quantique (QD) fonctionnalisé par un aptamère balise [187]**

Un des premiers exemples d'application pratique est l'élaboration d'un dispositif de bandelette-test pour la détection de l'adénosine et de la cocaïne [188] (Figure 37). Des agrégats de nanoparticules biotinylées et fonctionnalisées par des aptamères sont déposés sur une bandelette qui est ensuite séchée. L'immersion de l'extrémité de la bandelette dans une solution entraîne alors la réhydratation des agrégats. En l'absence de la cible, les agrégats ne peuvent migrer du fait de leur trop grande taille. En revanche, l'ajout de la cible entraîne la redispersion des nanoparticules, qui peuvent alors migrer à travers une membrane puis être capturées sur une fine ligne de streptavidine, entraînant l'apparition d'une coloration rouge.



**Figure 37 : Dispositif de bandelette-test pour la détection de l'adénosine et de la cocaïne** avant utilisation (A) et lors d'un test négatif (B) ou positif (C) [188]

Une méthode de détection colorimétrique de l'adénosine dans des échantillons d'urine a également été développée [189]. En l'absence d'analyte et à force ionique élevée, les nanoparticules d'or fonctionnalisées par l'aptamère s'agrègent par effet de sels, faisant passer la couleur de la solution du pourpre au violet. En présence de la cible, le repliement de l'aptamère en tétrade de G conduit à une coloration pourpre de la solution. Une limite de détection de 10 nM a été obtenue pour l'ATP.

### III. 2. 3. 1. 4. Résonance plasmonique de surface (RPS)

La résonance plasmonique de surface (RPS) est un système de détection basé sur la variation de l'indice de réfraction d'une surface sélective lors de l'interaction avec une cible spécifique [159,190] (Figure 38). La surface sélective est créée par immobilisation d'un ligand spécifique (ici l'aptamère) à la surface d'un prisme recouvert d'une mince couche métallique (argent ou or). A la surface du métal, des ondes oscillantes de densité surfacique de

charge appelées plasmons de surface peuvent être excitées sous un certain angle d'illumination, ce qui conduit à une décroissance de l'intensité réfléchi. Cet angle, appelé angle de résonance, dépend fortement de l'indice de réfraction de la surface. La fixation de la cible sur le ligand change la composition de l'interface, ce qui modifie son indice de réfraction, conduisant ainsi à un changement de l'angle de résonance. Il a été montré que le signal obtenu, mesuré en unités de résonance (RU), est proportionnel à la quantité de molécules fixées sur le ligand [159].

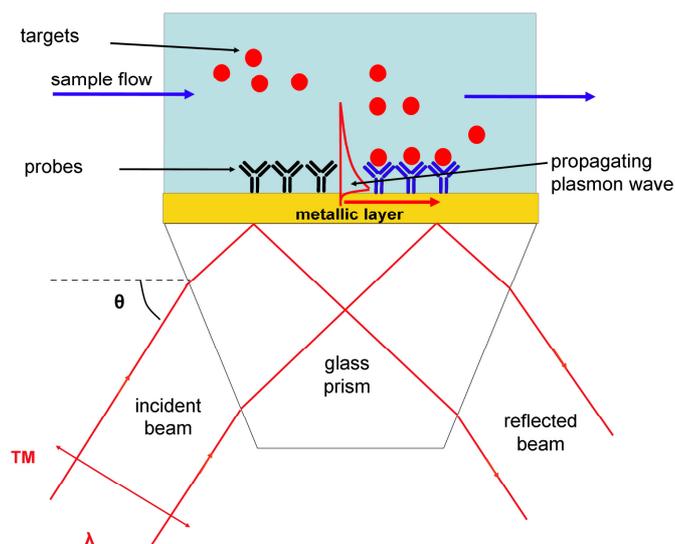


Figure 38 : Principe de la détection par RPS [191]

Plus récemment, la RPS a été développée comme méthode de transduction optique pour l'élaboration d'aptasenseurs, permettant ainsi de s'affranchir du marquage de l'aptamère ou de la cible [23,25]. Un aptasenseur a ainsi été élaboré par immobilisation après biotinylation d'un aptamère dirigé contre la protéine Tat (trans-activateur de transcription) du VIH-1 sur la surface d'une puce à RPS recouverte de dextran carboxylé puis modifiée par la streptavidine [192].

Une technique d'imagerie RPS enzymatiquement amplifiée (SPRI) a également été développée pour la détection de biomarqueurs protéiques à des concentrations picomolaires [193] (Figure 39). Les aptamères ARN immobilisés sur une microplaque sont mis en présence de la protéine cible, puis d'un anticorps conjugué à la peroxydase de raifort (horseradish peroxidase, HRP) afin de former un complexe « sandwich » aptamère-protéine-anticorps. La surface est ensuite exposée au substrat du HRP, qui conduit à la formation d'un précipité bleu foncé. Une très faible quantité de ce précipité sur la surface d'or permet d'amplifier significativement le signal et d'obtenir ainsi une sensibilité élevée (limite de détection de 500 fM et 1 pM pour la thrombine et le VEGF, respectivement).

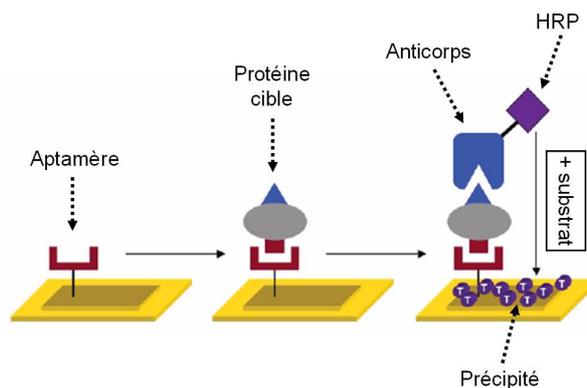


Figure 39 : Détection de protéines par SPRI [193]

Cependant, les cibles étudiées sont majoritairement des biomolécules de taille importante, car les petites molécules sont difficilement détectables par RPS. En effet, leur fixation sur l'aptamère immobilisé entraîne une faible variation de masse, donc une faible variation de l'indice de réfraction de la surface et de l'angle de résonance. L'effet amplificateur des nanoparticules d'or a donc été utilisé afin d'élaborer un aptasenseur permettant la détection sensible des petites molécules par RPS [194]. Un aptamère simple brin est d'abord immobilisé sur la surface d'or. Son hybridation avec le brin complémentaire fixé à une nanoparticule d'or entraîne une variation importante du signal RPS. Cependant, en présence de la cible, l'aptamère adopte une conformation différente qui empêche son hybridation avec le brin complémentaire. Ainsi, la variation du signal induite par l'hybridation avec le brin complémentaire sera inversement proportionnelle à la quantité de cible introduite. Un aptasenseur basé sur ce principe a donc été développé pour la détection de l'adénosine. Celui-ci présente une bonne sensibilité et une sélectivité élevée, avec une gamme dynamique allant de  $10^{-9}$  à  $10^{-6}$  M (Figure 40). Par la suite, cette stratégie pourrait être aisément transposée à la détection d'un large spectre de petites molécules.

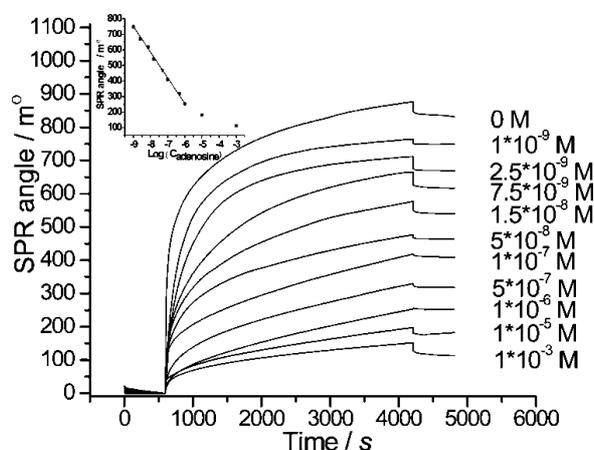


Figure 40 : Variation temporelle de l'angle SPR pour la détection de l'interaction entre l'aptamère et des NPs d'or fonctionnalisées par un brin complémentaire, après incubation de l'aptamère avec différentes

concentrations d'adénosine (0 à  $10^{-3}$  M) pendant 30 minutes. Encart : relation linéaire entre la variation de l'angle de résonance et la concentration en adénosine ( $10^{-9}$  à  $10^{-6}$  M) [194]

### III. 2. 3. 2. Aptasenseurs électrochimiques

La transduction électrochimique présente de nombreux avantages : sensibilité élevée, rapidité de la réponse, faible coût de production et possibilité de miniaturisation [25]. De plus, l'électrochimie offre une large gamme de techniques pour la détection, qui peuvent être choisies en fonction des contraintes imposées par chaque système.

#### III. 2. 3. 2. 1. Balises moléculaires

Une stratégie utilisant le concept de balise moléculaire consiste à détecter le changement de structure de l'aptamère induit par l'interaction avec sa cible grâce à un indicateur électroactif.

Une première approche consiste à immobiliser l'aptamère sur un support conducteur et à lui attacher un groupement redox. La liaison avec la cible induit un changement de conformation de l'aptamère qui modifie le transfert électronique entre le marqueur redox et l'électrode, permettant ainsi la détection de la cible.

Un aptasenseur électrochimique pour la détection de la thrombine a été élaboré en utilisant un aptamère bifonctionnalisé par un thiol à une extrémité et le bleu de méthylène (BM) à l'autre extrémité [195] (Figure 41).

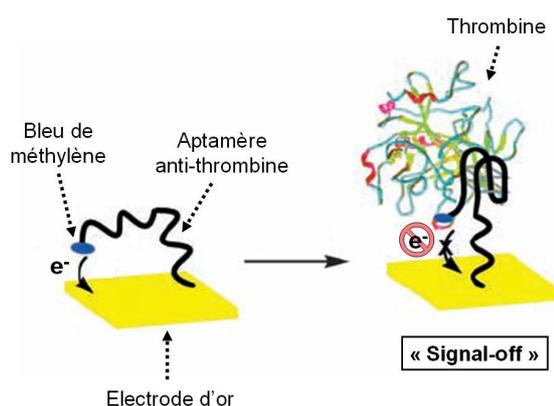


Figure 41 : Schéma d'un aptasenseur électrochimique pour la détection de la thrombine en format « signal-off » [195]

Le groupement thiol permet l'immobilisation de l'aptamère sur une électrode d'or par auto-assemblage via la formation d'une liaison S-Au. Le BM, qui peut être réduit en bleu de leucométhylène à la surface de l'électrode par gain de deux électrons, joue le rôle d'indicateur

redox. Le transfert électronique entre le BM et l'électrode, autorisé par la conformation flexible de l'aptamère libre, est altéré lors de la liaison avec la thrombine, qui entraîne la formation d'une structure rigide (tétrade de G). Cette approche a permis la détection de la thrombine par voltamétrie à impulsion différentielle (DPV : differential pulse voltammetry) avec une sensibilité de 10 nM. Ce format présente néanmoins l'inconvénient de fournir un signal négatif (« signal-off »), l'association entre l'aptamère et la thrombine entraînant une diminution de la réponse.

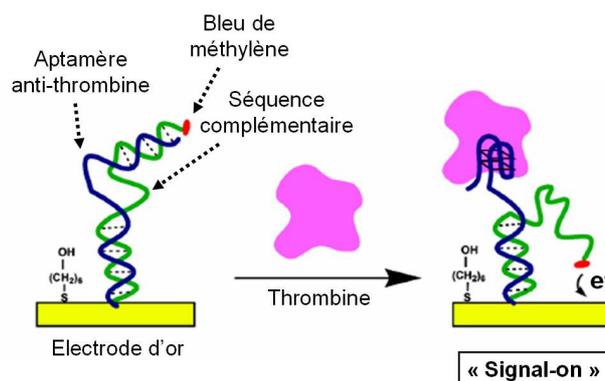
Afin de pallier ce problème, plusieurs aptasenseurs positifs (« signal-on ») ont été développés. Un aptamère anti-thrombine a été bifonctionnalisé par un thiol à une extrémité, afin de pouvoir être immobilisé sur l'électrode, et par un groupement ferrocène électroactif jouant le rôle de marqueur redox à l'autre extrémité [196]. En l'absence de cible, la chaîne d'aptamère modifiée, longue et flexible, interdit le contact électrique entre le ferrocène et l'électrode. L'interaction avec la thrombine rigidifie la structure de l'aptamère, ce qui réduit la distance de transfert électronique et aboutit ainsi à une augmentation du signal. La détection par DPV a permis d'obtenir une réponse linéaire dans la gamme 5-35 nM et une limite de détection de 0,5 nM. L'aptasenseur peut en outre être régénéré jusqu'à 25 fois sans perte significative de sensibilité. Cette méthode a également été appliquée à la détection électrochimique du PDGF à des concentrations picomolaires dans le sérum humain, en utilisant le BM comme marqueur redox [197]. De même, la cocaïne a pu être détectée jusqu'à 500  $\mu$ M dans des échantillons biologiques tels que le sérum fœtal de veau ou la salive humaine [198].

Afin d'améliorer le rapport signal/bruit, une approche basée sur l'utilisation de sondes ADN double brin assemblées sur une électrode d'or a été développée.

L'aptamère anti-thrombine peut ainsi s'hybrider avec une séquence complémentaire marquée par le BM, elle aussi immobilisée sur l'électrode [199]. L'ajout de la thrombine entraîne un changement conformationnel de l'aptamère, libérant la chaîne portant le BM qui peut alors entrer en contact avec l'électrode (Figure 42). Le courant faradique produit par le transfert électronique permet de détecter la thrombine jusqu'à 3 nM.

Une autre méthode met en œuvre une sonde ADN constituée d'un aptamère anti-ATP marqué par le ferrocène et de sa séquence complémentaire [200]. En présence d'ATP, l'oligonucléotide complémentaire est libéré, et l'aptamère forme une structure tridimensionnelle rigide qui amène le marqueur à proximité de l'électrode. Le transfert

électronique résultant permet de quantifier l'ATP sur une large gamme de concentration (10 nM – 1 mM) et avec une sensibilité élevée.

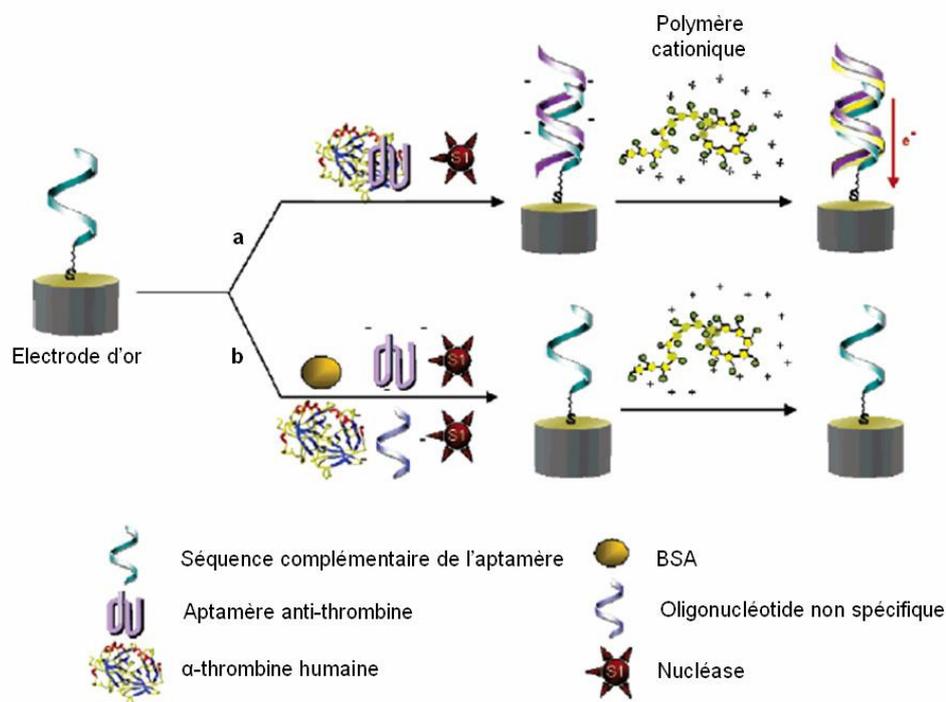


**Figure 42 : Schéma d'un aptasenseur électrochimique basé sur l'utilisation d'une sonde ADN double brin pour la détection de la thrombine en format « signal-on » [199]**

Une variante permet de s'affranchir du marquage covalent des oligonucléotides en intercalant le bleu de méthylène à l'intérieur du double brin de la structure tige-boucle d'un aptamère anti-thrombine modifié [201]. L'ajout de la cible, qui interagit avec la boucle, provoque l'ouverture de la tige et la libération de l'indicateur redox, aboutissant ainsi à une diminution significative du signal. La détection par chronoampérométrie et DPV a permis d'obtenir une sensibilité de 11 nM et une spécificité satisfaisante en présence d'ovalbumine et de  $\beta$ -caséine.

Des approches semblables ont décrit l'emploi d'indicateurs électroactifs cationiques (polythiophène fonctionnalisé par le ferrocène [202] ou  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  [203]) lié à l'électrode via des interactions électrostatiques avec les groupements phosphate de l'aptamère. La liaison de la cible (thrombine [202] ou lysozyme [203]) avec l'aptamère bloque l'interaction avec l'indicateur redox, ce qui entraîne une diminution de la réponse électrochimique. Ce format « signal-off » conduit cependant à des limites de détection peu satisfaisantes (seulement 1  $\mu\text{M}$  pour la thrombine et 0,5  $\mu\text{g/mL}$  pour le lysozyme). Une méthode de détection indirecte a donc été développée en utilisant le même polymère électroactif et une séquence complémentaire de l'aptamère immobilisée sur une électrode d'or [202] (Figure 43). Un excès d'aptamère est incubé avec la thrombine en solution, puis le mélange est mis en présence de nucléases afin de digérer tous les acides nucléiques libres, l'aptamère complexé étant protégé de la dégradation du fait de la liaison avec la thrombine. Un traitement thermique permet ensuite de dissocier l'aptamère de la cible, puis de l'hybrider avec la séquence complémentaire. La structure double brin résultante est chargée négativement et peut donc interagir avec le polymère cationique, ce qui entraîne une augmentation de la réponse voltamétrique de l'électrode

proportionnelle à la concentration en thrombine. Cette méthode permet d'améliorer la spécificité et la sensibilité de la détection (LOD de 75 nM, soit 75 fmol de protéine) mais requiert néanmoins de nombreuses étapes.



**Figure 43 : Aptasenseur électrochimique pour la détection indirecte de la thrombine à l'aide d'un polymère cationique [202].** Voie a : détection du signal généré par le polythiophène en présence du complexe thrombine/aptamère spécifique. Voie b : absence de signal en présence de BSA ou d'une séquence non spécifique.

### III. 2. 3. 2. 2. Transistor à effet de champ (TEC)

Le transistor à effet de champ (TEC) est un transistor unipolaire : son fonctionnement est basé sur l'action d'un champ électrique sur la forme et donc la conductivité d'un canal composé d'un seul type de porteurs de charges mobiles. Ce canal est un semi-conducteur avec un excédent d'électrons (dopage de type N), ou de trous (dopage de type P). Constitué de trois électrodes actives, le TEC permet le contrôle grâce à une électrode d'entrée (la grille) d'un courant ou d'une tension sur l'une des électrodes de sortie (le drain).

Les transistors à effet de champ permettent d'élaborer des aptasenseurs électrochimiques ne nécessitant pas d'indicateurs électroactifs.

Un TEC sélectif d'ion a été utilisé pour la détection de l'adénosine [204]. Un aptamère anti-adénosine est immobilisé à la surface du TEC puis hybridé avec un court oligonucléotide complémentaire. Lorsque l'adénosine interagit avec l'aptamère, le brin complémentaire est

déplacé, entraînant une modification du potentiel qui peut alors être détectée par spectroscopie d'impédance faradique. Une limite de détection de 2  $\mu\text{M}$  a ainsi pu être obtenue.

L'utilisation de nanomatériaux fournit également une nouvelle approche pour le développement d'aptasenseurs électrochimiques sans marquage et ultrasensibles. Un nanotube de carbone (NTC) a ainsi été employé comme TEC afin de suivre les interactions aptamère-protéine [205]. L'aptamère anti-thrombine est immobilisé sur la paroi du nanotube, qui est ensuite placé entre deux électrodes. La fixation de la thrombine sur l'aptamère modifie la conductance du système, ce qui permet de détecter la thrombine. L'intérêt majeur de l'utilisation des aptamères pour l'élaboration de TECs par rapport à celle des anticorps (immunoTECs) réside dans leur petite taille. En effet, la taille des anticorps ( $\sim 10$  nm) étant largement supérieure à la largeur de la double couche électrique, la plupart des charges des protéines fixées se trouvent à une distance supérieure à la longueur de Debye ( $\sim 3$  nm pour une force ionique de 10 mM) ce qui implique de faibles variations de potentiel. A l'inverse, les dimensions plus réduites des aptamères (1-2 nm) rendent possible la perturbation du potentiel par les protéines, car l'interaction a lieu à l'intérieur de la double couche électrique.

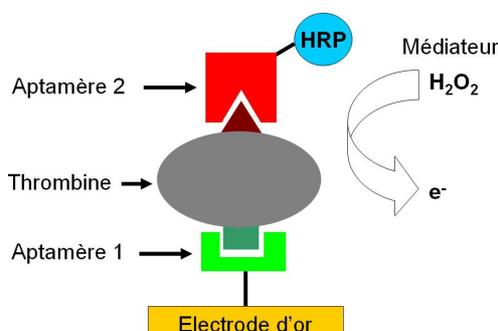
Une comparaison de la modification d'un NTC-TEC par des aptamères ou des anticorps a été effectuée [206]. Dans des conditions d'étude identiques, le NTC-TEC modifié par un aptamère s'est montré plus performant que le NTC-TEC modifié par un anticorps, et a de plus permis une détection très sensible de l'IgE (LOD de 250 pM).

### III. 2. 3. 2. 3. Configuration « sandwich »

Afin d'améliorer la spécificité et d'introduire des facteurs d'amplification augmentant la sensibilité, des configurations « sandwich » sont souvent employées. Ce format nécessite la présence de plusieurs épitopes sur la cible, ce qui est le cas de la thrombine qui possède deux sites de fixation auxquels peuvent se lier des aptamères.

Les propriétés biocatalytiques des enzymes sont généralement utilisées pour détecter et amplifier l'analyse des cibles. La glucose déshydrogénase (GDH) a par exemple été employée comme marqueur biocatalytique pour la détection ampérométrique amplifiée de la thrombine [207]. Deux aptamères différents reconnaissant chacun un site de fixation de la thrombine ont été utilisés : un aptamère de capture, immobilisé sur une électrode d'or via un groupement thiol terminal, et un aptamère rapporteur marqué par la GDH pour la détection. La mesure par chronoampérométrie du courant généré par addition de glucose a permis d'obtenir une limite de détection de 10 nM et une gamme linéaire de 40-100 nM.

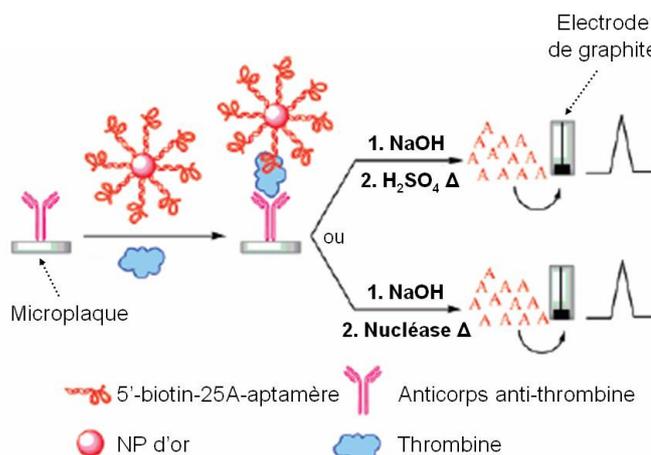
Une méthode similaire utilisant la peroxydase du raifort (HRP) comme marqueur enzymatique a été développée [208] (Figure 44). Les électrons produits lors de la réduction du substrat de l'enzyme, le peroxyde d'hydrogène, sont transférés vers l'électrode par l'intermédiaire d'un médiateur de diffusion. La thrombine a ainsi pu être détectée jusqu'à 80 nM de façon spécifique.



**Figure 44 : Aptasenseur électrochimique au format « sandwich » pour la détection de la thrombine à l'aide d'un marqueur enzymatique (d'après [208])**

Il est possible de substituer le marqueur enzymatique par des nanoparticules de platine (PtNPs) [209]. Les PtNPs catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène, permettant ainsi d'amplifier la détection de la thrombine et d'atteindre une LOD de 1 nM, ce qui représente une amélioration d'un facteur 80 par rapport à l'essai biocatalytique précédent, très similaire.

Outre leur rôle de catalyseur, les NPs peuvent aussi être employées comme transporteurs pour la détection électrochimique ultrasensible de protéines [210] (Figure 45).



**Figure 45 : Aptasenseur électrochimique au format « sandwich » pour la détection de la thrombine à l'aide de NPs fonctionnalisées par un aptamère possédant une séquence poly-A [210]**

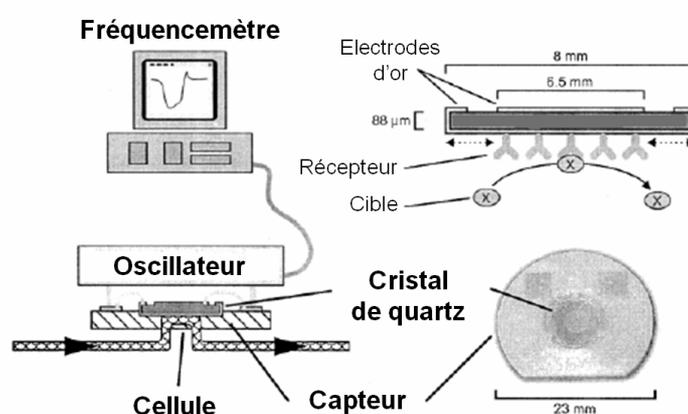
Des NPs d'or (AuNPs) fonctionnalisées par des aptamères anti-thrombine possédant une séquence poly-adénine (poly-A) se lient à la thrombine capturée par des anticorps anti-thrombine immobilisés sur une microplaque. Les nucléobases adénine sont libérées par dégradation en milieu acide ou en présence de nucléases et sont détectées directement par

DPV grâce à une électrode de graphite pyrolytique. Comme chaque NP comporte un nombre important d'aptamères, le signal correspondant à l'interaction avec la thrombine est amplifié, ce qui permet d'atteindre une limite de détection de 0,1 ng/mL.

Une autre stratégie d'amplification consiste à utiliser une séquence aptamère-promoteur afin de réaliser une amplification par cercle roulant (RCA : rolling circle amplification) [211]. La séquence aptamère-promoteur forme un complexe « sandwich » avec la protéine capturée par des anticorps immobilisés à la surface de l'électrode, et amorce une réaction de RCA in-situ qui génère des centaines de copies d'un ADN circulaire, conduisant à une amélioration significative de la sensibilité. Cette stratégie a permis la détection ultrasensible (LOD de 10 fM) du PDGF sur une large gamme de concentration (quatre ordres de grandeur).

### III. 2. 3. 3. Aptasenseurs acoustiques

Une autre technique de transduction mise en œuvre pour l'élaboration d'aptasenseurs est la microbalance à cristal de quartz (MCQ), un cas particulier de microbalance piézoélectrique (Figure 46).

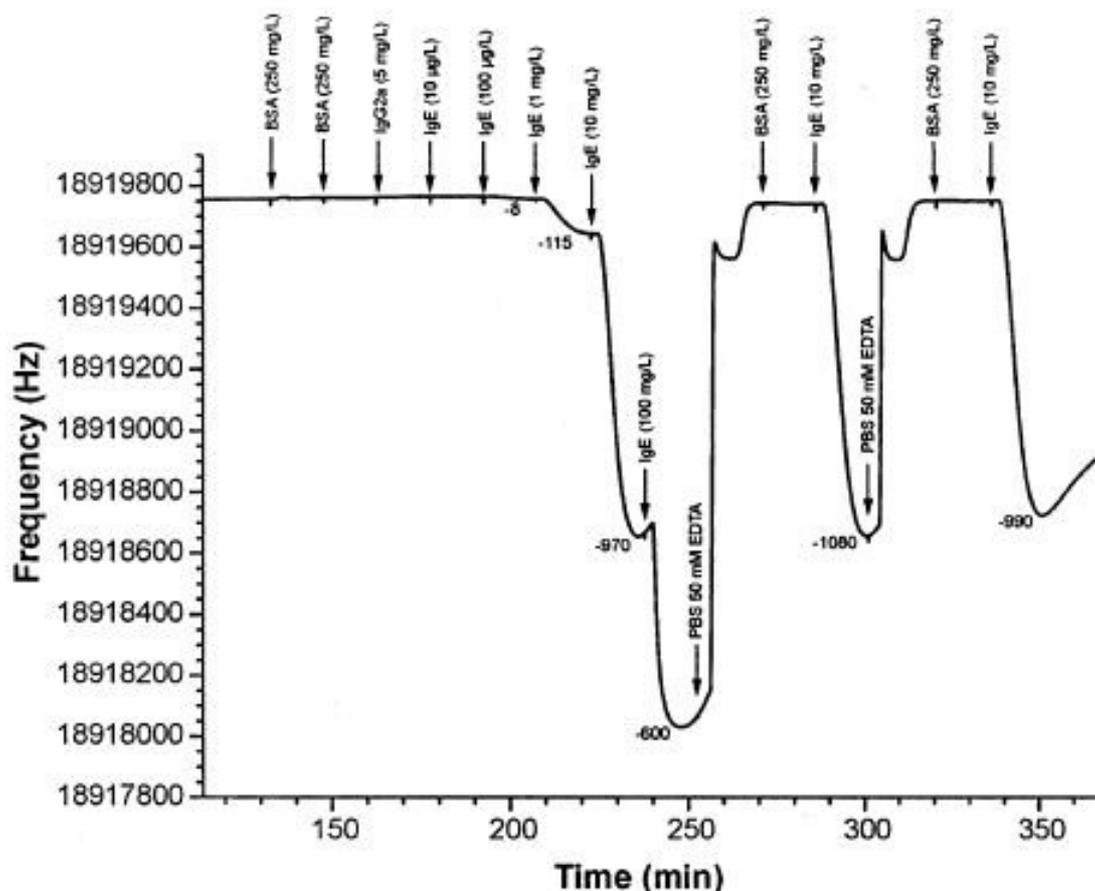


**Figure 46 :** Représentation schématique d'une MCQ (à gauche) et d'un cristal de quartz (en haut à droite) [214]. Le cristal de quartz assemblé sur le capteur est représenté en bas à droite.

Une microbalance piézoélectrique permet de mesurer des masses très faibles en mesurant le changement de fréquence associé d'un cristal piézoélectrique [212]. En raison de son excellent facteur de qualité, le quartz est le matériau le plus utilisé pour ce système de mesure, qui permet de suivre en temps réel les interactions entre biomolécules. Une fine lame de quartz est placée entre deux électrodes sur lesquelles sont immobilisées des biomolécules. L'application d'un potentiel sinusoïdal génère une onde acoustique dont la fréquence est

enregistrée. La fixation de la cible entraîne alors une diminution de la fréquence de résonance proportionnelle à l'augmentation de masse correspondante [213].

Un aptasenseur a ainsi été élaboré par immobilisation après biotinylation d'un aptamère dirigé contre la protéine Tat (trans-activateur de transcription) du VIH-1 sur une électrode d'or recouverte d'une couche de streptavidine intégrée dans un système en ligne [192]. Une limite de détection de 0,25 ppm a été obtenue. Une méthode similaire a également été utilisée pour la détection de la thrombine avec une limite de détection de 1 nM [215].



**Figure 47 : Variations de la fréquence d'oscillation d'un cristal de quartz recouvert avec l'aptamère anti-IgE [214].** Des injections préalables de BSA (250 mg/mL) permettent d'éliminer les interactions non spécifiques. L'injection d'un contrôle négatif (IgG2A, 5 mg/mL) ne génère aucun signal.

Un second système a été employé afin de comparer les performances obtenues par immobilisation d'un aptamère ADN ou d'un anticorps spécifiques de l'IgE humaine sur une électrode d'or [214] (Figure 47). En termes de spécificité et de sélectivité, les deux capteurs sont équivalents et conduisent à la détection de 0,5 nM d'IgE. Cependant, du fait de leur petite taille, les aptamères sont immobilisés de façon dense et correctement orientée, ce qui permet d'atteindre une gamme de linéarité 10 fois plus élevée qu'avec les anticorps. En outre, l'aptasenseur réalisé présente une stabilité accrue (plusieurs semaines) ainsi qu'une meilleure

tolérance vis-à-vis de cycles de régénération répétés, et permet la quantification de l'IgE dans des mélanges complexes sans effet de matrice.

La MCQ a également été utilisée lors de la sélection *in vitro* d'aptamères ARN dirigés contre le peptide Rev, impliqué dans l'infection par le VIH-1 [216]. L'immobilisation d'un peptide modèle sur l'électrode permet de suivre le processus de sélection et d'évaluer la constante d'association des séquences sélectionnées sans recourir au marquage radioactif ou fluorescent.

Les cristaux de quartz piézoélectriques peuvent aussi être employés pour l'élaboration d'aptasenseurs à onde acoustique de surface (surface acoustic wave SAW). Un capteur à ondes de Love couplé à des aptamères a ainsi été développé pour la détection de la thrombine et du peptide Rev [217]. Une onde acoustique horizontale transverse est guidée au sein d'une couche à la surface du capteur, ce qui conduit à une réduction de la dissipation d'énergie due au fluide et à une amélioration de la sensibilité (limite de détection de 75 pg/cm<sup>2</sup>). Le calibrage du capteur est effectué par corrélation entre la masse de protéines marquées fixées et l'intensité de fluorescence.

### III. 2. 4. Liste non exhaustive des applications analytiques utilisant des aptamères

Les différentes applications analytiques décrites dans ce chapitre sont regroupées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Liste non exhaustive des applications analytiques utilisant des aptamères

Application	Exemple de cibles	LOD	Gamme dynamique linéaire	Référence
<b><u>Techniques bioanalytiques</u></b>				
<b><i>Dosage par ELONA ou RLAA</i></b>				
Format sandwich	VEGF	1 pM		[122]
Format compétitif	RG19			[123]
Déplacement	Thrombine	~ 5 nM		[124]
Greffage sur NP	Toxines	pg - ng		[125]
<b><i>Dosage par PCR d'affinité</i></b>				
Ligature de proximité	Thrombine PGDF	pM zM		[126]
Protection par les exonucléases	Thrombine	fM		[127]
Couplage avec la CE	RT du VIH-1	30 fM		[128]

Application	Exemple de cibles	LOD	Gamme dynamique linéaire	Référence
<b><u>Techniques séparatives</u></b>				
<b><i>Chromatographie</i></b>				
Séparation de petites molécules	Analogues de l'adénosine			[130]
Séparation d'énantiomères	L-arginine			[78]
	D-peptide			[133]
	Tyrosine et analogues			[135]
Purification de protéines	LS-Ig			[136]
	TTF1			[92]
<b><i>Electrophorèse capillaire</i></b>				
Quantification directe par APCE/LIF	IgE	46 pM 40 nM	10 <sup>5</sup>	[138]
	Thrombine	10 nM		[144]
		2 nM		[145]
	Ricine	500 pM		[147]
	RT du VIH-1	50 nM		[140]
Quantification par ACE/LIFP	RT du VIH-1		0-35 nM	[143]
Essai compétitif pour détection UV d'impuretés énantiomériques	D-arginine	0,01%		[148,149]
Détection par CL	Hémine			[150]
	ADN	0,1 µM		
NECEEM	Thrombine	60 nM		[151]
<b><i>Electrochromatographie</i></b>				
Phases stationnaires spécifiques	FMN			[153]
Phases stationnaires G-quartet (séparation de protéines)	LgA et LgB			[154]
	Protéines du lait			[15]
	Albumines			[155]
Phases stationnaires G-quartet (séparation de petites molécules)	HAPs			[156]
	Dipeptides isomères			[157]
<b><u>Biocapteurs et bioessais</u></b>				
<b><i>Aptasenseurs optiques</i></b>				
Format direct (polarisation de fluorescence)	Thrombine	5 nM	nM-µM	[163]
	Protéines			[164]
Format compétitif (fluorescence)	Thrombine	1 nM	nM-µM	[165]

Application	Exemple de cibles	LOD	Gamme dynamique linéaire	Référence	
Format sandwich (anticorps traceur)	Ricine	320 ng/mL		[166]	
Photo-aptamères	Protéines			[61]	
Aptamère signal	Adénosine		$\mu\text{M}$ -mM	[167]	
Balises moléculaires (fluorescence)	Thrombine			[171]	
	Tat du VIH			[169]	
	Cocaïne		10 $\mu\text{M}$ -2,5 mM	[172]	
Balises moléculaires (FRET)	PDGF	10 ng/ $\mu\text{g}$ de protéines sériques		[175]	
Capteur colorimétrique	Cocaïne	0,5 $\mu\text{M}$	2-600 $\mu\text{M}$	[180]	
Emission lumineuse (complexe ruthénium/ADN)	Thrombine	10 pM			
	IgE	100 pM	0-50 nM	[181]	
	PDGF	1 nM			
Complexe aptamère/polymère cationique photoactif	Thrombine	10 pM		[182]	
	Thrombine	2 nM	50-120 nM	[184]	
	PDGF	3,2 nM		[185]	
	Cellules cancéreuses			[183]	
	Cytokines	83 aM	1 fM-100 pM	[186]	
	Adénosine	20 $\mu\text{M}$		[188]	
NPs fonctionnalisées (collection/détection)	Cocaïne	10 $\mu\text{M}$			
	ATP	10 nM	0,2-10 $\mu\text{M}$	[189]	
	Thrombine			[187]	
	Tat du VIH	0,25 ppm	0-2,5 ppm	[192]	
SPRI	Thrombine	500 fM			
	VEGF	1 pM		[193]	
SPR + NPs	Adénosine		nM- $\mu\text{M}$	[194]	
<b><i>Aptasenseurs électrochimiques</i></b>					
Balises moléculaires « signal-off »	Thrombine	10 nM		[195]	
		11 nM	0-50,8 nM	[201]	
		1 $\mu\text{M}$		[202]	
Balises moléculaires « signal-on »	Lysozyme	0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$		[203]	
		Thrombine	0,5 nM	5-35 nM	[196]
			75 nM		[202]
		3 nM		[199]	
	ATP		10 nM-1 mM	[200]	
	PDGF	50 pM		[197]	
	Cocaïne	10 $\mu\text{M}$		[198]	

Application	Exemple de cibles	LOD	Gamme dynamique linéaire	Référence
TEC	Adénosine	2 $\mu$ M		[204]
	Thrombine	10 nM	0-100 nM	[205]
	IgE	250 pM	250 pM-20 nM	[206]
Format sandwich (amplification enzymatique)	Thrombine	10 nM	10-100 nM	[207]
		80 nM		[208]
		3,5 nM		
Format sandwich (PtNPs)	Thrombine	1 nM		[209]
		0,1 ng/mL		[210]
RCA	PDGF	10 fM	fM-pM	[211]
<b><i>Aptasenseurs acoustiques</i></b>				
MCQ	Tat du VIH-1	0,25 ppm	0-1,25 ppm	[192]
	Thrombine	1 nM		[215]
	IgE	0,5 nM	50 nM	[214]
SAW	Thrombine Peptide Rev	75 pg/cm <sup>2</sup>		[217]

## Références bibliographiques

- [1] F. Chauveau, C. Pestourie, B. Tavitian, *Pathologie Biologie* 54 (2006) 251.
- [2] J.-J. Toulmé, G. Richard, *Médecine/sciences* 14 (1998) 155.
- [3] J.-J. Toulmé, S. Da Rocha, E. Dausse, L. Azéma, I. Lebars, S. Moreau, *Médecine Nucléaire* 31 (2007) 478.
- [4] A.D. Ellington, J.W. Szostak, *Nature* 346 (1990) 818.
- [5] C. Tuerk, L. Gold, *Science* 249 (1990) 505.
- [6] D. Robertson, G. Joyce, *Nature* 344 (1990) 467.
- [7] H. Thiesen, C. Bach, *Nucleic Acids Research* 18 (1990) 3203.
- [8] T. Blackwell, L. Kretzner, E. Blackwood, R. Eisenman, H. Weintraub, *Science* 250 (1990) 1149.
- [9] J.D. Watson, F.H. Crick, *Nature* 171 (1953) 737.
- [10] F.H.C. Crick, *Journal of Molecular Biology* 19 (1966) 548.
- [11] D.J. Patel, T. Hermann, *Journal of Molecular Biology* 294 (1999) 829.
- [12] A.V. Kulbachinskiy, *Biochemistry* 72 (2007) 1505.
- [13] in.
- [14] K. Hoogsteen, *Acta Crystallographica* 16 (1963) 907.
- [15] M.A. Rehder-Silinski, L.B. McGown, *Journal of Chromatography A* 1008 (2003) 233.
- [16] C. Tuerk, S. MacDougal, L. Gold, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (1992) 6988.
- [17] D.J. Schneider, J. Feigon, Z. Hostomsky, L. Gold, *Biochemistry* 34 (1995) 9599.
- [18] B.E. Eaton, L. Gold, D.A. Zichi, *Chemistry & Biology* 2 (1995) 633.
- [19] Y. Yang, M. Kochoyan, P. Burgstaller, E. Westhof, M. Famulok, *Science* 272 (1996) 1343.
- [20] G. Ghosh, D.-B. Huang, T. Huxford, *Current Opinion in Structural Biology* 14 (2004) 14.
- [21] D.J. Patel, A.K. Suri, F. Jiang, L. Jiang, P. Fan, R.A. Kumar, S. Nonin, *Journal of Molecular Biology* 272 (1997).
- [22] D.J. Patel, *Current Opinion in Chemical Biology* 1 (1997) 32.
- [23] S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini, *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2004) 2424.
- [24] S.D. Jayasena, *Clinical Chemistry* 45 (1999) 1628.
- [25] T. Mairal, V.C. Özalp, P.L. Sánchez, M. Mir, I. Katakis, C.K. O'Sullivan, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390 (2008) 989.
- [26] L. Gold, B. Polisky, O. Uhlenbeck, M. Yarus, *Annual Review of Biochemistry* 64 (1995) 763.
- [27] D. Nieuwlandt, M. Wecker, L. Gold, *Biochemistry* 34 (1995) 5651.
- [28] D.P. Bartel, M.L. Zapp, M.R. Green, J.W. Szostak, *Cell* 67 (1991) 529.
- [29] H. Chen, L. Gold, *Biochemistry* 33 (1994) 8746.
- [30] R.D. Jenison, S.C. Gill, A. Pardi, B. Polisky, *Science* 263 (1994) 1425.
- [31] C.L.A. Hamula, J.W. Guthrie, H. Zhang, X.-F. Li, X.C. Le, *Trends in Analytical Chemistry* 25 (2006) 681.
- [32] S.L. Clark, V.T. Remcho, *Electrophoresis* 23 (2002) 1335.
- [33] Z. Zhang, Y. Yang, D. Yang, H.J. Schluesener, *Biomolecular Engineering* 24 (2007) 583.
- [34] S.C.B. Gopinath, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (2007) 171.
- [35] A.D. Keefe, C. Wilson, *Current Opinion in Chemical Biology* 10 (2006) 607.

- [36] J. Micklefield, *Current Medicinal Chemistry* 8 (2001) 1157.
- [37] M.-L. Andreola, C. Calmels, J. Michel, J.-J. Toulmé, S. Litvak, *European Journal of Biochemistry* 267 (2000) 5032.
- [38] B.R. Shaw, M. Dobrikov, X. Wang, W. Jing, K. He, J.-L. Lin, P. Li, V. Rait, Z.A. Sergueeva, D. Sergueev, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1002 (2003) 12.
- [39] J.A. Latham, R. Johnson, J.J. Toole, *Nucleic Acids Research* 22 (1994) 2817.
- [40] S. Klussmann, B. Wlotzka, S. Leva, B. Eschgfäller, J. Burmeister, F. Kleinjung, C. Kaduk, P. Muhn, H.-S. Holger, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (2002) 8898.
- [41] S.D. Mendonsa, M.T. Bowser, *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004) 20.
- [42] S.D. Mendonsa, M.T. Bowser, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 5387.
- [43] T.W. Weigand, P.B. Williams, S.C. Dreskin, M.-H. Jouvin, J.-P. Kinet, D. Tasset, *Journal of Immunology* 157 (1996) 221.
- [44] J. Tang, J. Xie, N. Shao, Y. Yan, *Electrophoresis* 27 (2006) 1303.
- [45] D.T. Tran, K.P.F. Janssen, J. Pollet, E. Lammertyn, J. Anne, A. Van Schepdael, J. Lammertyn, *Molecules* 15 (2010) 1127.
- [46] S.D. Mendonsa, M.T. Bowser, *Journal of the American Chemical Society* 127 (2005) 9382.
- [47] D. Proske, M. Hofliger, R.M. Soll, A.G. Beck-Sickinger, M. Famulok, *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002) 11416.
- [48] A.P. Drabovich, M. Berezovski, V. Okhonin, S.N. Krylov, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 3171.
- [49] M. Berezovski, A. Drabovich, S.M. Krylova, M. Musheev, V. Okhonin, A. Petrov, S.N. Krylov, *Journal of the American Chemical Society* 127 (2005) 3165.
- [50] A. Drabovich, M. Berezovski, S.N. Krylov, *Journal of the American Chemical Society* 127 (2005) 11224.
- [51] M. Berezovski, M. Musheev, A. Drabovich, S.N. Krylov, *Journal of the American Chemical Society* 128 (2006) 1410.
- [52] M. Berezovski, M. Musheev, A. Drabovich, J.V. Jitkova, S.N. Krylov, *Nature Protocols* 1 (2006) 1359.
- [53] A. Vater, F. Jarosch, K. Buchner, S. Klussmann, *Nucleic Acids Research* 31 (2003) e130.
- [54] R. White, C. Rusconi, E. Scardino, A. Wolberg, J. Lawson, M. Hoffman, B. Sullenger, *Molecular Therapy* 4 (2001) 567.
- [55] L. Chaloin, M.J. Lehmann, G. Sczakiel, T. Restle, *Nucleic Acids Research* 30 (2002) 4001.
- [56] R.E. Martell, J.R. Nevins, B.A. Sullenger, *Molecular Therapy* 6 (2002) 30.
- [57] B.S. Singer, T. Shtatland, D. Brown, L. Gold, *Nucleic Acids Research* 25 (1997) 781.
- [58] C. Lorenz, F. von Pelchrzim, R. Schroeder, *Nature Protocols* 1 (2006) 2204.
- [59] J.-D. Wen, D.M. Gray, *Nucleic Acids Research* 32 (2004) e182.
- [60] K.B. Jensen, B.L. Atkinson, M.C. Willis, T.H. Koch, L. Gold, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (1995) 12220.
- [61] T.H. Koch, M.C. Golden, B.D. Collins, M.C. Willis, *Journal of Biotechnology* 81 (2000) 167.
- [62] H. Petach, L. Gold, *Current Opinion in Biotechnology* 13 (2002) 309.
- [63] J.C. Cox, P. Rudolph, A.D. Ellington, *Biotechnology Progress* 14 (1998) 845.
- [64] J.C. Cox, A.D. Ellington, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9 (2001) 2525.

- [65] J.C. Cox, A. Hayhurst, J. Hesselberth, T.S. Bayer, G. Georgiou, A.D. Ellington, *Nucleic Acids Research* 30 (2002) e108.
- [66] P.W. Goertz, J.C. Cox, A.D. Ellington, *Journal of the Association for Laboratory Automation* 9 (2004) 150.
- [67] G.M. Stovall, J.C. Cox, A.D. Ellington, *Journal of the Association for Laboratory Automation* 9 (2004) 117.
- [68] D. Eulberg, K. Buchner, C. Maasch, S. Klussmann, *Nucleic Acids Research* 33 (2005) e45.
- [69] G. Hybarger, J. Bynum, R.F. Williams, J.J. Valdes, J.P. Chambers, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384 (2006) 191.
- [70] Y. Miyachi, N. Shimizu, C. Ogino, A. Kondo, *Nucleic Acids Research* 38 (2010) e21/1.
- [71] H.P. Hofmann, S. Limmer, V. Hornung, M. Sprinzl, *RNA* 3 (1997) 1289.
- [72] J. Ciesiolka, J. Gorski, M. Yarus, *RNA* 1 (1995) 538.
- [73] D. Mann, C. Reinemann, R. Stoltenburg, B. Strehlitz, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338 (2005) 1928.
- [74] D.E. Huizenga, J.W. Szostak, *Biochemistry* 34 (1995) 656.
- [75] M. Sassanfar, J.W. Szostak, *Nature* 364 (1993) 550.
- [76] P.C. Anderson, S. Mecozzi, *Journal of the American Chemical Society* 127 (2005) 5290.
- [77] C.T. Lauhon, J.W. Szostak, *Journal of the American Chemical Society* 117 (1995) 1246.
- [78] A. Geiger, P. Burgstaller, H.v.d. Eltz, A. Roeder, M. Famulok, *Nucleic Acids Research* 24 (1996) 1029.
- [79] M. Famulok, *Journal of the American Chemical Society* 116 (1994) 1698.
- [80] I. Majerfeld, D. Puthenvedu, M. Yarus, *Journal of Molecular Evolution* 61 (2005) 226.
- [81] Q. Yang, I.J. Goldstein, H.-Y. Mei, D.R. Engelke, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1998) 5462.
- [82] S.Y. Low, J.E. Hill, J. Peccia, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 386 (2009) 544.
- [83] K.P. Williams, X.-H. Liu, T.N.M. Schumacher, H.Y. Lin, D.A. Ausiello, P.S. Kim, D.P. Bartel, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1997) 11285.
- [84] S.T. Wallace, R. Schroeder, *RNA* 4 (1998) 112.
- [85] C. Boiziau, E. Dausse, L. Yurchenko, J.-J. Toulme, *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999) 12730.
- [86] F. Ducongé, J.J. Toulmé, *RNA* 5 (1999) 1605.
- [87] F. Rahimi, K. Murakami, J.L. Summers, C.-H.B. Chen, G. Bitan, *PLoS One* 4 (2009) e7694.
- [88] S.D. Bell, J.M. Denu, J.E. Dixon, A.D. Ellington, *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998) 14309.
- [89] R.K. Mosing, S.D. Mendonsa, M.T. Bowser, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 6107.
- [90] D. Jellinek, L.S. Green, C. Bell, N. Janjic, *Biochemistry* 33 (1994) 10450.
- [91] J. Ruckman, L.S. Green, J. Beeson, S. Waugh, W.L. Gillette, D.D. Henninger, L. Claesson-Welsh, N. anjic, *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998) 20556.
- [92] M.B. Murphy, S.T. Fuller, P.M. Richardson, S.A. Doyle, *Nucleic Acids Research* 31 (2003) e110.
- [93] J.R. Hesselberth, D. Miller, J. Robertus, A.D. Ellington, *Journal of Biological Chemistry* 275 (2000) 4937.

- [94] S. Ringquist, T. Jones, E.E. Snyder, T. Gibson, I. Boni, L. Gold, *Biochemistry* 34 (1995) 3640.
- [95] W. Pan, R.C. Craven, Q. Qiu, C.B. Wilson, J.W. Wills, S. Golovine, J.-F. Wang, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (1995) 11509.
- [96] D. Shangguan, Y. Li, Z. Tang, Z.C. Cao, H.W. Chen, P. Mallikaratchy, K. Sefah, C.J. Yang, W. Tan, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006) 11838.
- [97] R.R. White, B.A. Sullenger, C.P. Rusconi, *Journal of Clinical Investigation* 106 (2000) 929.
- [98] R. Robinson, *PLoS Biology* 2 (2004) e28.
- [99] G. Werstuck, M.R. Green, *Science* 282 (1998) 296.
- [100] K.F. Blount, R.R. Breaker, *Nature Biotechnology* 24 (2006) 1558.
- [101] J.P. Gallivan, *Current Opinion in Chemical Biology* 11 (2007) 612.
- [102] in.
- [103] T.S. Bayer, C.D. Smolke, *Nature Biotechnology* 23 (2005) 337.
- [104] P.D. Good, A.J. Krikos, S.X.L. Li, E. Bertrand, N.S. Lee, L. Giver, A. Ellington, J.A. Zaia, J.J. Rossi, D.R. Engelke, *Gene Therapy* 4 (1997) 45.
- [105] M. Vuyisich, P.A. Beal, *Chemistry & Biology* 9 (2002) 907.
- [106] C. Pestourie, B. Tavitian, F. Duconge, *Biochimie* 87 (2005) 921.
- [107] L.C. Bock, L.C. Griffin, J.A. Latham, E.H. Vermaas, J.J. Toole, *Nature* 355 (1992) 564.
- [108] L.C. Griffin, T.G. F., L.C. Bock, J.J. Toole, L.L.K. Leung, *Blood* 81 (1993) 3271.
- [109] C.P. Rusconi, E. Scardino, J. Layzer, G.A. Pitoc, T.L. Ortel, D. Monroe, B.A. Sullenger, *Nature* 419 (2002) 90.
- [110] C.P. Rusconi, J.D. Roberts, G.A. Pitoc, S.M. Nimjee, R.R. White, G. Quick, E. Scardino, W.P. Fay, B.A. Sullenger, *Nature Biotechnology* 22 (2004) 1423.
- [111] C.E. Tucker, L.-S. Chen, M.B. udkins, J.A. Farmer, S.C. Gill, D.W. Drolet, *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications* 732 (1999) 203.
- [112] M.C. Willis, B. Collins, T. Zhang, L.S. Green, D.P. Sebesta, C. Bell, E. Kellogg, S.C. Gill, A. Magallanez, S. Knauer, R.A. Bendele, P.S. Gill, N. Janjic, *Bioconjugate Chemistry* 9 (1998) 573.
- [113] in.
- [114] L. Cerchia, F. Duconge, C. Pestourie, J. Boulay, Y. Aissouni, K. Gombert, B. Tavitian, V. de Franciscis, D. Libri, *PLoS computational biology* 3 (2007) e123.
- [115] B.J. Hicke, A.W. Stephens, *Journal of Clinical Investigation* 106 (2000) 923.
- [116] Y. Lin, Q. Qiu, S.C. Gill, S.D. Jayasena, *Nucleic Acids Research* 22 (1994) 5229.
- [117] Y. Lin, P. Abeysinghe, K.M. Morden, S.D. Jayasena, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (1995) 11044.
- [118] J. Charlton, G.P. Kirschenheuter, D. Smith, *Biochemistry* 36 (1997) 3018.
- [119] N.M. Bless, D. Smith, J. Charlton, B.J. Czermak, H. Schmal, H.P. Friedl, P.A. Ward, *Current Biology* 7 (1997) 877.
- [120] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman and Co, New York, 2002.
- [121] O'Sullivan, C. K., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 372 (2002) 44.
- [122] D.W. Drolet, L. Moon-McDermott, T.S. Romig, *Nature Biotechnology* 14 (1996) 1021.
- [123] N. Kawazoe, Y. Ito, Y. Imanishit, *Biotechnology Progress* 13 (1997) 873.
- [124] E. Baldrich, J.L. Acero, G. Reekmans, W. Laureyn, C.K. O'Sullivan, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 4774.

- [125] J.G. Bruno, J.L. Kiel, *BioTechniques* 32 (2002) 182.
- [126] S. Fredriksson, M. Gullberg, J. Jarvius, C. Olsson, K. Pietras, S.M. Gústafsdóttir, A. Östman, U. Landegren, *Nature Biotechnology* 20 (2002) 473.
- [127] X.-L. Wang, F. Li, Y.-H. Su, X. Sun, X.-B. Li, H.J. Schluesener, F. Tang, S.-Q. Xu, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 5605.
- [128] H. Zhang, Z. Wang, X.-F. Li, X.C. Le, *Angewandte Chemie International* 45 (2006) 1576.
- [129] C. Ravelet, C. Grosset, E. Peyrin, *Journal of Chromatography A* 1117 (2006) 1.
- [130] Q. Deng, I. German, D. Buchanan, R.T. Kennedy, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 5415.
- [131] B. Sellergren, *Journal of Chromatography A* 906 (2001) 227.
- [132] O. Hofstetter, H. Lindstrom, H. Hofstetter, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 2119.
- [133] M. Michaud, E. Jourdan, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, E. Peyrin, *Journal of the American Chemical Society* 125 (2003) 8672.
- [134] A. Brumbt, C. Ravelet, C. Grosset, A. Ravel, A. Villet, E. Peyrin, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 1993.
- [135] C. Ravelet, R. Boulkedid, A. Ravel, C. Grosset, A. Villet, J. Fize, E. Peyrin, *Journal of Chromatography A* 1076 (2005) 62.
- [136] T.S. Romig, C. Bell, D.W. Drolet, *Journal of Chromatography B* 731 (1999) 275.
- [137] C. Giovannoli, C. Baggiani, L. Anfossi, G. Giraudi, *Electrophoresis* 29 (2008) 3349.
- [138] I. German, D.D. Buchanan, R.T. Kennedy, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 4540.
- [139] D.D. Buchanan, E.E. Jameson, J. Perlette, A. Malik, R.T. Kennedy, *Electrophoresis* 24 (2003) 1375.
- [140] V. Pavski, X.C. Le, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 6070.
- [141] H. Wang, M. Lu, X.C. Le, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 4985.
- [142] M.S. Munson, J.M. Meacham, D. Ross, L.E. Locascio, *Electrophoresis* 29 (2008) 3456.
- [143] H. Fu, J.W. Guthrie, X.C. Le, *Electrophoresis* 27 (2006) 433.
- [144] C.-C. Huang, H.-T. Chang, Z. Cao, W. Tan, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 6973.
- [145] Y. Li, L. Guo, F. Zhang, Z. Zhang, J. Tang, J. Xie, *Electrophoresis* 29 (2008) 2570.
- [146] M. Song, Y. Zhang, T. Li, Z. Wang, J. Yin, H. Wang, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 873.
- [147] A.J. Haes, B.C. Giordano, G.E. Collins, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 3758.
- [148] J. Ruta, C. Ravelet, I. Baussanne, J.-L. Décout, E. Peyrin, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 4716.
- [149] J. Ruta, C. Ravelet, I. Baussane, J. Fize, J.-L. Décout, E. Peyrin, *Journal of Separation Science* 31 (2008) 2239.
- [150] T. Li, B. Li, S. Dong, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (2007) 887.
- [151] M. Berezovski, R. Nutiu, Y. Li, S.N. Krylov, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 1382.
- [152] M. Berezovski, S.N. Krylov, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 1526.
- [153] S.L. Clark, V.T. Remcho, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 5692.
- [154] M.A. Rehder, L.B. McGown, *Electrophoresis* 22 (2001) 3759.
- [155] L.W. Dick Jr, B.J. Swintek, L.B. McGown, *Analytica Chimica Acta* 519 (2004) 197.
- [156] R.B. Kotia, L. Li, L.B. McGown, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 827.
- [157] J.A.M. Charles, L.B. McGown, *Electrophoresis* 23 (2002) 1599.
- [158] T.U. Vo, L.B. McGown, *Electrophoresis* 27 (2006) 749.
- [159] E. Luzi, M. Minunni, S. Tombelli, M. Mascini, *Trends in Analytical Chemistry* 22 (2003) 810.
- [160] D.R. Thevenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, *Pure and Applied Chemistry* 71 (1999) 2333.

- [161] B.M. Paddle, *Biosensors and Bioelectronics*, 11 (1996) 1079.
- [162] J.W. Guthrie, Camille L.A. Hamula, H. Zhang, X.C. Le, *Methods* 38 (2006) 324.
- [163] G.M. Hieftje, R.A. Potyrailo, R.C. Conrad, A.D. Ellington, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 3419.
- [164] T.G. McCauley, N. Hamaguchia, M. Stanton, *Analytical Biochemistry* 319 (2003) 244.
- [165] M. Lee, D.R. Walt, *Analytical Biochemistry* 282 (2000) 142.
- [166] R. Kirby, E.J. Cho, B. Gehrke, T. Bayer, Y.S. Park, D.P. Neikirk, J.T. McDevitt, A.D. Ellington, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 4066.
- [167] S.D. Jhaveri, R. Kirby, R. Conrad, E.J. Maglott, M. Bowser, R.T. Kennedy, G. Glick, A.D. Ellington, *Journal of the American Chemical Society* 122 (2000) 2469.
- [168] S. Tyagi, F.R. Kramer, *Nature Biotechnology* 14 (1996) 303.
- [169] R. Yamamoto, P.K.R. Kumar, *Genes to Cells* 5 (2000) 389.
- [170] J.J. Li, X. Fang, W. Tan, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292 (2002) 31.
- [171] N. Hamaguchi, A. Ellington, M. Stanton, *Analytical Biochemistry* 294 (2001) 126.
- [172] M.N. Stojanovic, P. de Prada, D.W. Landry, *Journal of the American Chemical Society* 123 (2001) 4928.
- [173] R. Nutiu, Y. Li, *Journal of the American Chemical Society* 125 (2004) 4771.
- [174] M.R. Henry, W.S. Priscilla, J. Sun, D.M. Kelso, *Analytical Biochemistry* 276 (1999) 204.
- [175] M.C. Vicens, A. Sen, A. Vanderlaan, T.J. Drake, W. Tan, *ChemBioChem* 6 (2005) 900.
- [176] J. Nick Taylor, Q. Darugar, K. Kourentzi, R.C. Willson, C.F. Landes, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 373 (2008) 213.
- [177] S. Song, L. Wang, J. Li, J. Zhao, C. Fan, *Trends in Analytical Chemistry* 27 (2008) 108.
- [178] C.J. Yang, S. Jockusch, M. Vicens, N.J. Turro, W. Tan, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005) 17278.
- [179] Z. Cao, W. Tan, *Chemistry--A European Journal* 11 (2005) 4502.
- [180] M.N. Stojanovic, D.W. Landry, *Journal of the American Chemical Society* 124 (2002) 9678.
- [181] Y. Jiang, X. Fang, C. Bai, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 5230.
- [182] H.-A. Ho, M. Leclerc, *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004) 1384.
- [183] J.K. Herr, J.E. Smith, C.D. Medley, D. Shangguan, W. Tan, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 2918.
- [184] V. Pavlov, Y. Xiao, B. Shlyahovsky, I. Willner, *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004) 11768.
- [185] C.-C. Huang, Y.-F. Huang, Z. Cao, W. Tan, H.-T. Chang, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 5735.
- [186] Y.-Y. Li, C. Zhang, B.-S. Li, L.-F. Zhao, X.-b. Li, W.-J. Yang, S.-Q. Xu, *Clinical Chemistry (Washington, DC, United States)* 53 (2007) 1061.
- [187] M. Levy, S.F. Cater, A.D. Ellington, *ChemBioChem* 6 (2005) 2163.
- [188] L. Juewen, M. Debapriya, L. Yi, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 45 (2006) 7955.
- [189] S.-J. Chen, Y.-F. Huang, C.-C. Huang, K.-H. Lee, Z.-H. Lin, H.-T. Chang, *Biosensors & Bioelectronics* 23 (2008) 1749.
- [190] P. Schuck, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 26 (1997) 541.
- [191] in.
- [192] S. Tombelli, M. Minunni, E. Luzi, M. Mascini, *Bioelectrochemistry* 67 (2005) 135.

- [193] Y. Li, H.J. Lee, R.M. Corn, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 1082.
- [194] J. Wang, H.S. Zhou, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 7174.
- [195] X. Yi, L.A. A, H.A. J, P.K. W, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 44 (2005) 5456.
- [196] A.-E. Radi, J.L. Acero Sanchez, E. Baldrich, C.K. O'Sullivan, *Journal of the American Chemical Society* 128 (2006) 117.
- [197] R.Y. Lai, K.W. Plaxco, A.J. Heeger, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 229.
- [198] B.R. Baker, R.Y. Lai, M.S. Wood, E.H. Doctor, A.J. Heeger, K.W. Plaxco, *Journal of the American Chemical Society* 128 (2006) 3138.
- [199] Y. Xiao, B.D. Piorek, K.W. Plaxco, A.J. Heeger, *Journal of the American Chemical Society* 127 (2005) 17990.
- [200] X. Zuo, S. Song, J. Zhang, D. Pan, L. Wang, C. Fan, *Journal of the American Chemical Society* 129 (2007) 1042.
- [201] G.S. Bang, S. Cho, B.-G. Kim, *Biosensors & Bioelectronics* 21 (2005) 863.
- [202] F. Le Floch, H.A. Ho, M. Leclerc, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 4727.
- [203] A.K.H. Cheng, B. Ge, H.-Z. Yu, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 5158.
- [204] M. Zayats, Y. Huang, R. Gill, C.-a. Ma, I. Willner, *Journal of the American Chemical Society* 128 (2006) 13666.
- [205] H.-M. So, K. Won, Y.H. Kim, B.-K. Kim, B.H. Ryu, P.S. Na, H. Kim, J.-O. Lee, *Journal of the American Chemical Society* 127 (2005) 11906.
- [206] K. Maehashi, T. Katsura, K. Kerman, Y. Takamura, K. Matsumoto, E. Tamiya, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 782.
- [207] K. Ikebukuro, C. Kiyohara, K. Sode, *Biosensors & Bioelectronics* 20 (2005) 2168.
- [208] M. Mir, M. Vreeke, I. Katakis, *Electrochemistry Communications* 8 (2006) 505.
- [209] R. Polsky, R. Gill, L. Kaganovsky, I. Willner, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 2268.
- [210] P. He, L. Shen, Y. Cao, D. Li, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 8024.
- [211] L. Zhou, L.-J. Ou, X. Chu, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 7492.
- [212] J.-M. Friedt, *Bulletin de l'Union des Physiciens* (2003) 429.
- [213] G. Sauerbrey, *Zeitschrift fuer Physik* 155 (1959) 206.
- [214] M. Liss, B. Petersen, H. Wolf, E. Prohaska, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 4488.
- [215] T. Hianik, V. Ostatna, Z. Zajacova, E. Stoikova, G. Evtugyn, *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters* 15 (2005) 291.
- [216] S. Fukusho, H. Furusawa, Y. Okahata, *Chemical Communications* 1 (2002) 88.
- [217] M.D. Schlensog, T.M.A. Gronewold, M. Tewes, M. Famulok, E. Quandt, *Sensors and Actuators B: Chemical* 101 (2004) 308.

# **Chapitre II**

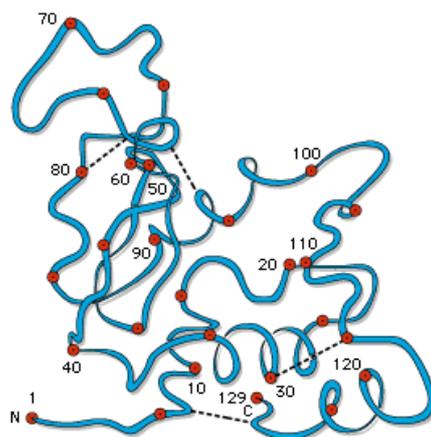
**Modifications de surface pour la  
caractérisation du lysozyme par  
électrophorèse capillaire**

## Introduction

Des aptamères ont été sélectionnés contre tout type de cible, allant de la petite molécule à la cellule entière, en passant par les protéines. L'affinité de l'aptamère pour les cibles protéiques est généralement plus élevée ( $10^{-10} < K_d < 10^{-9}$  M) que pour des molécules de taille plus modeste ( $10^{-7} < K_d < 10^{-6}$  M) [1]. Les aptamères ont été employés en électrophorèse capillaire pour le dosage de cibles protéiques telles que l'immunoglobuline E (IgE) [2], la ricine [3] et la transcriptase inverse du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) [4]. Plusieurs études ont également été menées pour la quantification de la thrombine et la caractérisation de son interaction avec l'aptamère [2, 5-8]. Notre choix s'est porté sur le couple aptamère/lysozyme, pour lequel un aptamère a été identifié [9], mais n'ayant fait l'objet d'aucune étude par électrophorèse capillaire. En effet, le lysozyme étant une protéine très basique ( $pI > 11$ ), sa caractérisation par électrophorèse capillaire nécessite un traitement spécifique de la paroi du capillaire. Au cours de cette étude préliminaire, nous avons donc évalué différents types de traitement de surface du capillaire pour la caractérisation du lysozyme par électrophorèse capillaire de zone (CZE), les conditions optimales choisies devant également être compatibles avec l'analyse de l'aptamère.

# 1. Description et propriétés du lysozyme

Le lysozyme est une protéine globulaire ( $M_m = 14\ 307$  Da) constituée d'une chaîne unique comportant 129 acides aminés [10]. Sa structure est liée à la présence de 4 ponts disulfures [11] (Figure 48).



**Figure 48 : Structure simplifiée du lysozyme de blanc d'œuf de poule [12].** Les cercles sont placés tous les 5 résidus, les numéros tous les 10 résidus. Les 4 ponts disulfures sont représentés par les lignes discontinues.

Cette hydrolase acide, synthétisée dans les globules blancs, participe à la défense immunitaire en détruisant les cellules bactériennes par hydrolyse du peptidoglycane des parois cellulaires [13]. Le lysozyme est présent dans de nombreux tissus et liquides biologiques (larmes, salive, sérum sanguin...) ainsi que dans le blanc d'œuf, où il représente environ 3% de l'ensemble des protéines présentes. L'activité du lysozyme peut être inhibée par différents composés, entre autre les surfactants comme le dodécylsulfate de sodium (SDS) [13].

Le lysozyme est une protéine très basique : son point isoélectrique (pI) est de 11,35 pour une force ionique de 0,1 M [14]. Il est soluble dans l'eau à 10 mg/mL ; conservées entre 2 et 8°C à pH 4-5, les solutions aqueuses de lysozyme sont stables pendant 1 mois.

Le dosage du lysozyme dans le sérum sanguin permet de contrôler l'efficacité du traitement de certaines maladies sanguines comme la leucémie, d'orienter le diagnostic en néphrologie, et participe à la surveillance du rejet de greffe d'organes [15]. Le lysozyme est également utilisé pour le traitement des blessures et des infections, du fait de ses propriétés anti-inflammatoires, et pour la conservation des aliments, du fait des ses propriétés antibactériennes [16]. Dans le domaine agro-alimentaire, le lysozyme est notamment employé comme additif pour la conservation des fromages à pâte cuite [17] ou des vins [18, 19]. Cependant, le lysozyme est un allergène majeur de l'œuf : des études cliniques ont révélé que

des quantités infimes de lysozyme pouvaient causer des réactions allergiques [20]. Il est donc indispensable de pouvoir détecter la présence de lysozyme dans les produits destinés à la consommation des patients allergiques. Actuellement, seul un test par immunodosage ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilisant des anticorps est disponible commercialement (Calbiotech Inc., Spring Valley, CA, USA) ; malgré sa sensibilité (0,021 ng/mL), ce type de test présente néanmoins un certain nombre d'inconvénients (succession d'étapes fastidieuses, temps de réaction élevé, utilisation de réactifs coûteux...) [21]. Il semble donc intéressant de développer un nouveau système de diagnostic pour cette protéine.

## 2. Modifications de la paroi interne des capillaires pour l'étude de protéines par électrophorèse capillaire

L'étude des protéines par électrophorèse capillaire montre que celles-ci ont tendance à s'adsorber sur la paroi interne des capillaires en silice vierge (Figure 49). Ce phénomène, plus marqué dans le cas de protéines basiques, entraîne une diminution importante des performances électrophorétiques : variations de l'écoulement électroosmotique, élargissement et asymétrie du pic, perte d'efficacité de séparation. De nombreuses stratégies ont été adoptées afin de réduire ou d'éliminer cette adsorption indésirable : emploi de pH extrêmes [22, 23], augmentation de la force ionique [24], ajouts d'additifs zwitterioniques [25]. Cependant, l'approche la plus fréquemment utilisée est le traitement, dynamique ou permanent, de la surface du capillaire.

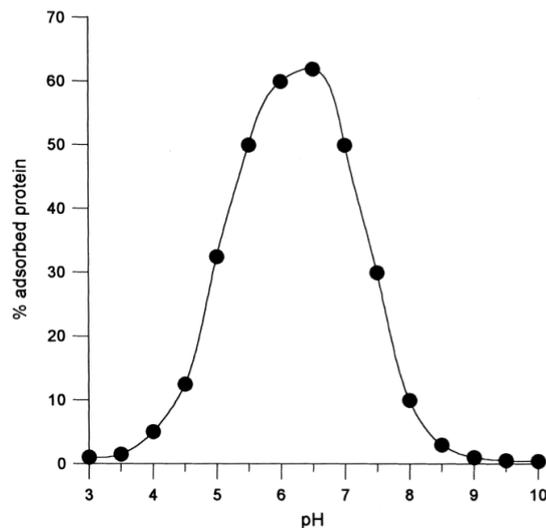
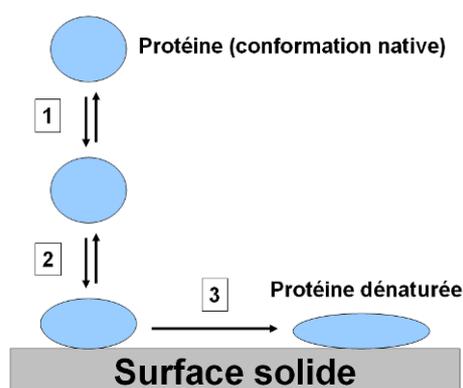


Figure 49 : Adsorption de la myoglobine sur un capillaire en silice vierge en fonction du pH de l'électrolyte de séparation (à force ionique identique) [26]

### 2. 1. Mécanisme d'adsorption des protéines sur la surface du capillaire en silice

L'adsorption des protéines sur la paroi interne des capillaires en silice vierge est un phénomène non spécifique mettant en jeu des interactions électrostatiques (via les groupements silanol chargés négativement présents sur la surface du capillaire), hydrophobes

et de Van der Wals. Le processus d'adsorption peut être décomposé en trois étapes distinctes [27] (Figure 50) : (1) diffusion de la protéine à proximité de la surface, (2) adsorption réversible rapide puis (3) dénaturation conduisant à l'adsorption irréversible de la protéine sur la surface. L'étape 2 (adsorption réversible) peut elle-même être subdivisée en cinq sous-étapes [28] : (a) départ des molécules d'eau et des ions de la double couche électrique entourant la protéine, (b) départ des molécules d'eau et des ions de la proximité de la surface, (c) interactions entre la protéine et la surface, (d) réarrangement structural de la protéine et (e) réarrangement structural des molécules d'eau et des ions dans la solution. L'affinité d'une protéine pour la surface ne dépend donc pas uniquement de la force des interactions protéine/surface (sous-étape c), mais également de la conformation adoptée par la protéine sur la surface (sous-étape d) ainsi que de la force ionique et de la nature des sels présents en solution (sous-étapes a, b et e).



**Figure 50 : Mécanisme simplifié de l'adsorption d'une protéine sur une surface solide en trois étapes :** (1) diffusion de la protéine à proximité de la surface, (2) adsorption réversible puis (3) dénaturation irréversible de la protéine sur la surface [26].

Les protéines adsorbées subissent généralement des changements conformationnels impliquant la perte d'éléments de structure essentiels tels que des hélices alpha ou des feuillet bêta [29], et entraînant une augmentation de l'aire de contact avec la surface : l'adsorption devient alors irréversible. Cette hypothèse est confirmée par le fait que la capacité de désorption de la protéine diminue avec le temps de résidence sur la surface [30].

La quantité de protéine adsorbée dépend de nombreux paramètres, et notamment de l'hydrophobie de la surface [31] (une surface plus hydrophobe conduit à une plus grande adsorption de la protéine) et des propriétés de la protéine [32] (stabilité de la structure, taille, charge, composition, conformation stérique...).

Les interactions électrostatiques protéine/surface dépendent de l'état de charge de la surface et de celui de la protéine, eux-mêmes dépendant du pH et de la composition de l'électrolyte. L'adsorption de protéines de pI variés à la surface d'un capillaire en silice vierge à pH 7 a ainsi été étudiée par Towns et Regnier [33]. Les protéines possédant un pI supérieur au pH de l'électrolyte sont totalement adsorbées à la surface du capillaire du fait de leur charge positive. Les protéines dont le pI est inférieur au pH de l'électrolyte présentent une adsorption partielle, qui décroît avec le pI, du fait de la répulsion coulombienne entre la protéine chargée négativement et la surface du capillaire. Ainsi, l'augmentation de la charge nette négative de la protéine entraîne une diminution de l'adsorption, mais l'existence d'une adsorption résiduelle montre que la charge nette globale ne peut à elle seule expliquer le phénomène d'adsorption. Outre l'existence éventuelle d'interactions électrostatiques avec des charges locales positives (exemple : fonction amine, pKa ~ 10), le processus fait également intervenir des interactions de type hydrophobe. Par ailleurs, la localisation des charges sur la protéine influence fortement les interactions électrostatiques avec la surface : les configurations pour lesquelles de nombreuses charges positives sont proches des charges de la surface conduisent ainsi à l'interaction la plus favorable [34]. Par conséquent, la flexibilité structurelle de la protéine conditionne la force de l'interaction électrostatique avec la surface.

La stabilité structurelle de la protéine est également déterminante pour les autres types d'interactions. Les protéines globulaires (lysozyme,  $\alpha$ -chymotrypsinogène, ribonucléase,  $\beta$ -lactoglobuline), considérées comme « dures » ou rigides du fait de leur stabilité interne élevée, présentent une faible adsorption sur les surfaces hydrophiles en l'absence d'interactions électrostatiques [31, 35]. A l'inverse, les protéines ayant une faible stabilité interne (BSA, HSA, IgG,  $\alpha$ -lactalbumine,  $\beta$ -caséine, hémoglobine), considérées comme « molles », ont tendance à s'adsorber sur tout type de surface indépendamment des interactions électrostatiques, grâce au gain d'entropie conformationnelle résultant de l'adsorption [36].

## ***2. 2. Modification dynamique de la surface du capillaire***

Les modifications dynamiques consistent le plus souvent à rincer le capillaire à l'aide d'une solution contenant un agent modificateur qui peut être soit un polymère, soit un composé de faible masse moléculaire. La modification de la paroi du capillaire étant basée

sur un phénomène d'adsorption, une faible quantité d'agent modificateur est généralement ajoutée dans l'électrolyte de séparation afin de maintenir le revêtement sur la surface du capillaire, ce qui pose problème lors de l'étude d'interactions du fait d'éventuelles réactions parasites. La durée de vie des capillaires modifiés dynamiquement peut en outre être améliorée en introduisant une étape de régénération.

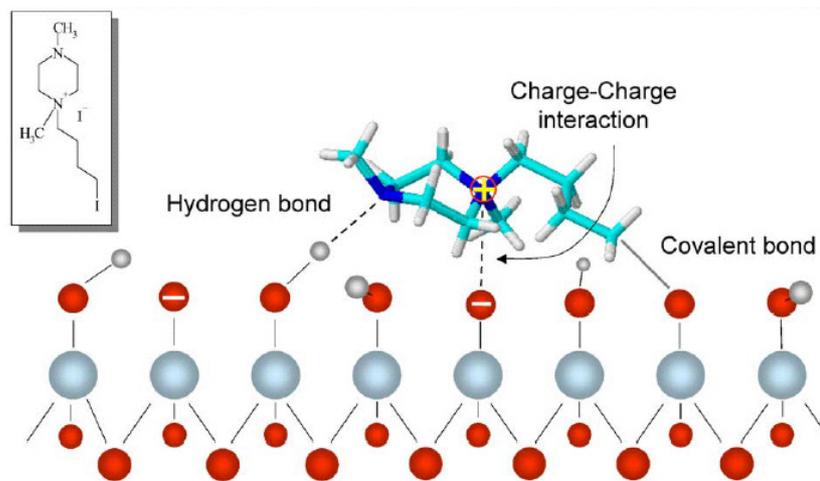
## 2. 2. 1. Additifs de faible masse moléculaire

Les additifs de faible masse moléculaire permettent de réduire l'adsorption des protéines, soit par écrantage électrostatique entre la protéine cationique et la paroi du capillaire, soit par association avec les charges négatives de la surface du capillaire conduisant à une réduction ou une inversion de la charge effective de surface [37].

### 2.2.1.1. Amines cationiques

Les amines cationiques sont les additifs les plus couramment employés. En effet, l'adsorption des amines sur les groupements silanol de la paroi du capillaire permet à la fois de défavoriser les interactions avec les composés basiques et de réduire le flux électroosmotique [38, 39]. Une comparaison entre monoamines, diamines et oligoamines a montré que la spermine (tétraamine) et la tétraéthylène pentamine (TEPA) étaient les plus efficaces pour prévenir l'adsorption des protéines : une concentration de 1 mM dans l'électrolyte de séparation est suffisante pour réduire l'adsorption de 90% [26]. Cependant, ces oligoamines ne sont efficaces que dans les conditions pour lesquelles les amines sont protonées. Les ammoniums quaternaires, qui possèdent une charge nette positive permanentes, sont donc plus efficaces à pH élevé, et permettent également de réduire le flux électroosmotique [37]. De plus, les oligoamines doivent être présentes dans l'électrolyte de séparation. Righetti et ses collaborateurs ont récemment introduit une nouvelle classe d'additifs trifonctionnels (ammonium quaternaire, amine tertiaire et iodure de  $\omega$ -alkyle) baptisés « Skorprios » [40-42]. La Figure 51 présente une proposition de mécanisme d'interaction entre l'un de ces composés et la paroi du capillaire en silice vierge. Le capillaire est préconditionné à l'aide d'une solution basique de Skorprio millimolaire, puis rincé avec l'électrolyte de séparation. Il en résulte un flux électroosmotique inversé élevé, stable pendant de nombreuses analyses (diminution de 3-4% par analyse). Un lavage à l'aide d'une

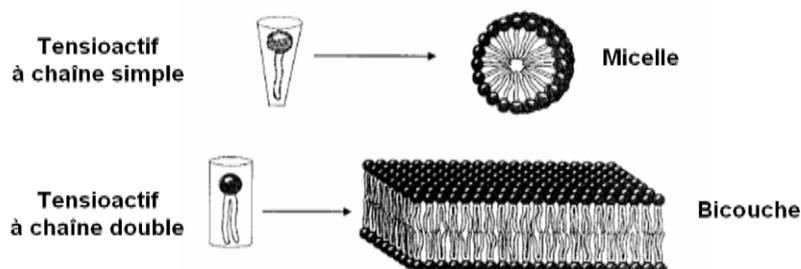
solution micellaire de tensioactif (SDS) est cependant nécessaire après chaque analyse du fait de l'adsorption irréversible résiduelle des protéines.



**Figure 51 :** Proposition d'un mécanisme d'interaction entre une pipérazine quaternaire [iodure de (*N*-méthyl, *N*-4-iodobutyl)-*N*-méthylpipérazine (M1C4I)] et la paroi du capillaire en silice [40]. Le groupement amine tertiaire forme une liaison hydrogène, l'azote quaternaire une liaison ionique et l'iodure de  $\omega$ -alkyle une liaison covalente.

### 2.2.1.2. Tensioactifs neutres ou cationiques

Une autre stratégie consiste à ajouter un tensioactif neutre ou cationique dans l'électrolyte de séparation. Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles composées d'une tête hydrophile et d'une ou plusieurs chaînes hydrophobes. En milieu libre, lorsque la concentration en tensioactif est supérieure à la concentration micellaire critique (CMC), les tensioactifs monomères s'agrègent sous la forme de micelles sphériques (cas des tensioactifs à chaîne simple) ou de bicouches (cas des tensioactifs à chaîne double) de façon à minimiser l'interaction défavorable entre les chaînes carbonées et l'eau (Figure 52) [43].



**Figure 52 :** Structure des agrégats formés par un tensioactif à chaîne simple ou à chaîne double [43]

L'adsorption d'un tensioactif cationique sur une surface de silice suit une série d'étapes successives [44]. A faible concentration (très inférieure à la CMC), l'adsorption du tensioactif est due à l'interaction électrostatique entre les espèces monomères isolées et les

groupements silanol de surface, de charge opposée. La concentration surfacique de tensioactif augmente avec la concentration de tensioactif en solution, entraînant une diminution de la distance entre molécules adsorbées. A la concentration pour laquelle une interaction latérale a lieu entre deux molécules de tensioactif adjacentes, la densité d'adsorption augmente brusquement, ce qui traduit la formation d'agrégats. L'observation de surfaces de silice par microscopie à force atomique (AFM) montre que les tensioactifs à chaîne simple tels que le bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB) forment des micelles sphériques aplaties appelées « hémimicelles » [45-47], tandis que les tensioactifs à chaîne double tels que le bromure de didodécyldiméthylammonium (DDAB) forment une bicouche uniforme [47]. La structure des agrégats de surface a une conséquence directe sur la performance des tensioactifs en tant que modificateurs de la paroi des capillaires. Tout d'abord, l'ajout de CTAB ou de DDAB dans l'électrolyte de séparation conduit dans les deux cas à une inversion du flux électroosmotique [43]. Cette inversion présente une importance et une stabilité moindre dans le cas des tensioactifs à chaîne simple, qui doivent donc être présents dans l'électrolyte de séparation pour être efficaces [43]. A l'inverse, les tensioactifs à chaîne double possèdent un effet rémanent et peuvent de ce fait être utilisés comme modificateurs semi-permanents. Cette stabilité plus importante du revêtement obtenu est associée à un recouvrement plus dense et plus homogène de la surface, permettant ainsi une prévention plus efficace de l'adsorption des protéines [47].

Dans le cas de tensioactifs neutres, les tensioactifs zwitterioniques sont plus efficaces que les tensioactifs non ioniques pour la prévention de l'adsorption des protéines : une concentration de 0,3% en sulfobétaïne SB-16 est suffisante pour inhiber de 90% l'adsorption de la myoglobine [48]. De plus, l'interaction entre la protéine et la paroi du capillaire est inversement proportionnelle à la CMC du tensioactif. Celle-ci étant liée à l'hydrophobie, l'utilisation des tensioactifs zwitterioniques les plus hydrophobes permet d'optimiser l'écrantage de la surface et de minimiser l'adsorption des protéines [48].

## 2. 2. 2. Polymères solubles

Des polymères solubles, neutres ou chargés, sont également utilisés comme modificateurs dynamiques ou semi-permanents de la paroi des capillaires. Synthétiques ou naturels, ces polymères entraînent une modification du potentiel et une augmentation de la viscosité à la surface du capillaire [49]. Afin d'assurer la stabilité des capillaires modifiés dynamiquement, une régénération régulière est nécessaire, ainsi que l'ajout éventuel de

l'agent modificateur dans l'électrolyte de séparation. En effet, la répétition des analyses entraîne une dégradation progressive du revêtement, et donc une diminution des performances du capillaire. Des étapes de rinçage fastidieuses sont également souvent requises entre chaque analyse.

### **2.2.2.1. Polymères neutres**

Les polymères neutres sont le plus souvent employés car ils entraînent une réduction ou une suppression du flux électroosmotique, ainsi que des interactions électrostatiques entre l'analyte et les parois du capillaire. L'hydrophilie du polymère est un paramètre crucial : en effet, son augmentation permet de réduire les interactions analyte/surface, mais conduit à une diminution de la stabilité du revêtement adsorbé.

Plusieurs dérivés cellulosiques tels que l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) ou l'hydroxyéthylcellulose (HEC) ont été identifiés comme additifs permettant un écrantage efficace des silanols ainsi que la suppression du flux électroosmotique [50].

L'oxyde de polyéthylène (PEO) a été utilisé comme additif pour prévenir l'adsorption lors de la séparation de protéines [51], mais une perte d'efficacité est observée pour des valeurs de pH supérieures à 8 [52]. Une réduction du flux électroosmotique d'environ un ordre de grandeur par rapport à un capillaire en silice vierge est observée à pH 7, mais n'est plus effective à pH 8,2. En effet, les groupements silanol de la paroi interne du capillaire doivent être protonés totalement afin de favoriser l'interaction avec le PEO par liaison hydrogène. Le capillaire doit donc être rincé par une solution acide puis par le PEO avant la modification et entre chaque analyse afin d'assurer un revêtement stable et efficace [53]. Une étape de régénération de 1 heure doit également être effectuée toutes les 30 analyses environ [50]. L'injection d'une zone de SDS permet d'améliorer l'efficacité d'un facteur 30 [52]. De plus, l'addition de 0,01% de PEO dans l'échantillon diminue significativement l'adsorption des protéines. Le PEO présente en outre l'avantage d'être compatible avec la détection par spectrométrie de masse (MS), et a été employé pour l'analyse de protéines basiques par CE-MS via une interface à électronebulisation (ESI) [54].

Le polyvinylpyrrolidone (PVP) est un modificateur dynamique efficace nécessitant une simple étape de régénération entre chaque analyse. Il offre une réduction du flux électroosmotique plus importante que le PEO et des temps de régénération significativement plus courts (3 minutes au lieu de 1 heure) [50].

La modification dynamique par l'alcool polyvinylique (PVA) à 0,05% conduit à la quasi-suppression du flux électroosmotique ( $0,5-2.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$ ) jusqu'à pH 8 [55]. Cependant, la séparation efficace de protéines basiques nécessite un pH inférieur à 5 [56].

#### **2.2.2.2. Polymères chargés**

L'adsorption de polymères chargés apporte des charges positives ou négatives sur la paroi interne du capillaire, ce qui entraîne un changement de direction et/ou d'intensité du flux électroosmotique. Cette méthode est utilisée en particulier pour répondre à certains besoins spécifiques, tels qu'une séparation rapide ou la résolution d'analytes chargés positivement.

Un flux électroosmotique inversé peut être obtenu en recouvrant la paroi du capillaire par un polymère cationique tel que le polyéthylèneimine (PEI) par simple percolation d'une solution de PEI de masse moléculaire élevée [57]. La couche de polymère adsorbée physiquement présente une stabilité élevée sur une large gamme de pH (3 – 11) [57]. L'ajout de PEI dans l'électrolyte de séparation entraîne une légère augmentation du flux électroosmotique anodique, mais n'apporte pas d'amélioration notable au niveau de la reproductibilité des analyses [58] ; de plus, une diminution de la sélectivité et des efficacités de séparation des protéines basiques est observée [58], sans doute liée à l'existence d'interactions protéine-polymère-surface [56].

De même, le bromure d'hexadiméthrine, ou polybrène (PB), peut être employé comme modificateur dynamique pour la séparation de protéines et de peptides [59]. Le couplage avec la spectrométrie de masse (MS) est en outre possible car le PB n'entraîne pas de suppression d'ionisation, et est donc compatible avec la source MS. La stabilité de la modification dynamique peut être renforcée par la mise en œuvre de dépôts successifs de polymères ioniques (SMIL : Successive Multiple Ionic Polymer Layer) [60]. Une première couche cationique de PB est déposée, suivie d'un polymère anionique tel que le sulfate de dextran, l'acide alginique ou l'acide hyaluronique, puis le PB est de nouveau introduit afin d'obtenir un état de charge globalement positif de la paroi interne du capillaire (Figure 53). Le revêtement ainsi obtenu présente une excellente stabilité temporelle (plus de 600 analyses) et vis-à-vis des pH extrêmes (NaOH 1 M et HCl 0,1 M), ainsi qu'une bonne efficacité pour l'analyse de protéines basiques, même à pH proche du pI de la protéine [60].

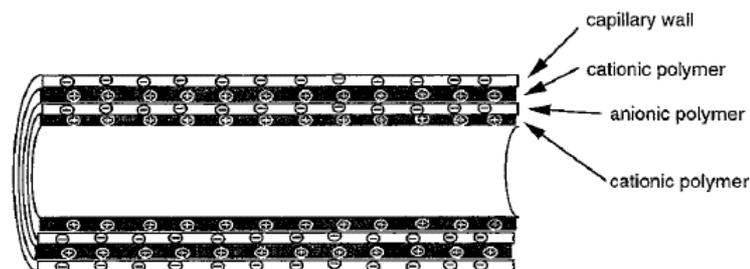


Figure 53 : Coupe schématique d'un capillaire en silice vierge modifié dynamiquement par SMIL [60]

Des modifications de la paroi interne du capillaire par adsorption d'une double-couche de polymères de charges opposées sont aussi proposées. La formation de cette double-couche est réalisée par rinçage successif du capillaire à l'aide d'une solution de polymère cationique puis d'une solution de polymère anionique. La paroi interne du capillaire est alors globalement chargée négativement, ce qui permet de réaliser des séparations en polarité positive, tout en minimisant l'interaction analyte/paroi, et d'obtenir un flux électroosmotique indépendant du pH de l'électrolyte. Une modification dynamique a ainsi été réalisée à l'aide du PB et du sulfonate de polyvinyle (PVS), un polymère anionique, et appliqué à l'analyse de peptides par CE-MS [61].

## 2. 3. Modification permanente de la surface du capillaire

Les polymères utilisés comme additifs pour la modification dynamique des capillaires peuvent également être greffés de façon permanente sur la paroi interne du capillaire. Bien que leur préparation soit souvent plus délicate à mettre en œuvre, les capillaires modifiés de façon permanente se révèlent généralement plus efficaces pour l'élimination des interactions analyte/paroi, et plus stables que les capillaires modifiés dynamiquement [62]. Deux approches ont été développées : l'une consiste à adsorber physiquement le polymère sur la surface de silice vierge ou préalablement traitée chimiquement, l'autre vise à l'immobiliser de façon covalente par greffage chimique sur la paroi interne du capillaire.

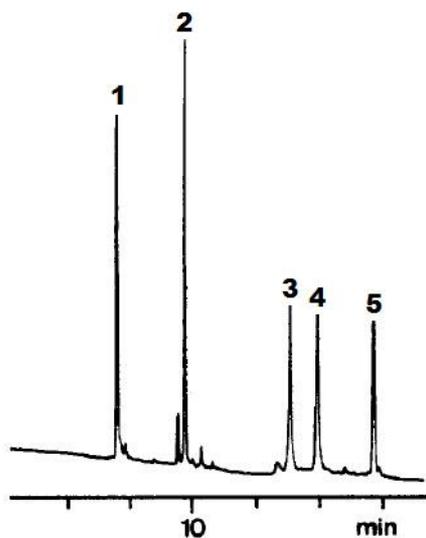
### 2. 3. 1. Adsorption physique

L'approche la plus simple à mettre en œuvre consiste à adsorber un polymère hydrophile neutre ou cationique sur la surface de silice. Après percolation d'une solution de polymère puis élimination de l'excédent, le film de polymère adsorbé sur la paroi de silice

permet de masquer ou de neutraliser les effets dus aux groupements silanol. L'immobilisation du polymère est parfois accompagnée d'une réticulation thermique ou chimique afin de stabiliser la couche déposée.

Ce procédé a permis d'éliminer le flux électroosmotique par dépôt sur la paroi interne du capillaire de polymères neutres tels que plusieurs dérivés cellulosiques. Des dépôts de méthylcellulose ont ainsi été réalisés, suivis d'une réticulation à température élevée par le formaldéhyde [63]. Lors de l'immobilisation de l'hydroxyéthylcellulose (HEC) ou de l'hydroxypropylcellulose (HPC), un traitement thermique à 140°C permet de faire réagir chimiquement la cellulose substituée par un groupement hydroxyalkyle avec la silice de la paroi [64]. Le dépôt obtenu est stable entre pH 3 et pH 10 et peut notamment être utilisé pour la focalisation isoélectrique (CIEF) des protéines.

D'autres polymères neutres présentant des interactions fortes avec la silice ont également été employés pour modifier la surface des capillaires. Ainsi l'alcool polyvinylique (PVA) traité thermiquement à 140°C forme un dépôt stable jusqu'à pH 10, permettant de séparer des mélanges de protéines basiques ou acides avec une excellente efficacité [65] (Figure 54).



**Figure 54 : Séparation de protéines basiques en capillaire modifié de façon permanente par le PVA [55].** Echantillon : cytochrome c (1), lysozyme (2), trypsine (3), trypsinogène (4) et  $\alpha$ -chymotrypsinogène (5). Capillaire : diamètre interne 75  $\mu$ m, longueur totale 70 cm, détection 57 cm, PVA (MW 50 000, Aldrich) immobilisé thermiquement. Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 50 mM (pH 3,0). Conditions : 30 kV (357 V/cm) ; 69  $\mu$ A ; 20°C. Injection électrocinétique : 10 kV ; 2,5 s. Détection : UV, 214 nm.

Une tentative de désactivation des capillaires par une solution de protéines a en outre été décrite [66]. La méthode consiste à adsorber du fibrinogène sur la paroi de silice puis à lui faire subir un traitement thermique à 70°C pendant 20 minutes. Le film protéique ainsi formé

semble immobilisé irréversiblement et empêche l'adsorption des protéines. De plus, le flux électroosmotique est réduit d'environ 30% à pH 7,5 et présente une bonne stabilité.

Il est également possible d'adsorber le polymère sur une surface préalablement traitée par greffage chimique, notamment à l'aide d'un silane hydrophobe [67]. L'adsorption de tensioactifs non-ioniques linéaires (Tween) ou ramifiés (Brij) sur un capillaire traité par un silane hydrophobe permet d'améliorer la biocompatibilité de la surface [68]. La partie hydrosoluble du tensioactif semble former une couche hydrophile qui masque le film de silane et les silanols résiduels, ce qui permet de séparer des mélanges de protéines acides ou basiques à pH neutre. Cependant, le manque de stabilité du film adsorbé nécessite la présence de tensioactif dans l'électrolyte de séparation. Cette limitation peut être levée par l'emploi de surfaces rendues hydrophobes par formation de chaînes orientées de polyalkylsiloxanes, qui conduit à une meilleure stabilité du revêtement [69]. La stabilité de la sous-couche peut être améliorée en formant des dépôts par la technique sol-gel. Dans le cas du méthacryloxypropyltriméthoxysilane (MAPS), des films présentant une excellente résistance à l'hydrolyse acide et basique sont ainsi obtenus, ce qui n'est pas le cas avec une silanisation simple [70].

### 2. 3. 2. Greffage chimique covalent

Une autre stratégie consiste à greffer sur la paroi du capillaire un composé ou polymère hydrophile de façon covalente. En effet, les groupements silanol offrent diverses possibilités pour le traitement chimique des capillaires.

Les premières tentatives de greffage chimique font référence à l'emploi de composés hydrophiles de faible masse moléculaire. Une modification par des fonctions diol, réalisée par silanisation de la paroi avec du glycidoxypropyltriméthoxysilane (GPTS) puis hydrolyse acide a été décrite par Bruin et al. [71]. Le capillaire obtenu permet de séparer des protéines basiques à pH 4, mais la dégradation de la forme des pics observée au-delà de pH 5 en limite l'application.

L'efficacité de la désactivation peut être améliorée en greffant des films polymères sur la surface du capillaire. Du polyéthylène glycol (PEG), polymère neutre et hydrophile, a ainsi été greffé sur la paroi préalablement modifiée par du GPTS en solution dans le toluène [72]. Si une diminution significative de l'adsorption des protéines est observée, le domaine

d'utilisation est cependant très restreint ( $3 < \text{pH} < 5$ ) en raison de l'élargissement et de la dissymétrie des pics. Une amélioration du processus de greffage des chaînes de PEG a permis d'élaborer des capillaires mieux adaptés à l'analyse des protéines [73].

Une autre voie intéressante consiste à greffer du PEG ainsi que des fonctions ammonium quaternaire sur la paroi du capillaire [74]. La présence de charges positives sur la surface limite les interactions avec les protéines basiques et provoque une inversion du flux électroosmotique pour des valeurs de pH inférieures à 5,8.

Un procédé différent dans lequel la surface du capillaire est recouverte d'un film épais de polymère époxy a également été introduit par Towns et al. [75]. Le greffage du GPTS sur la paroi est suivi de la polymérisation, en présence d'un catalyseur, d'une pellicule de 1,2-diglycidoxyéthane, puis de glycidol. Les capillaires obtenus présentent une bonne stabilité (durée de vie supérieure à 120 heures) et permettent de résoudre des protéines acides et basiques avec un taux de récupération élevé sur une large gamme de pH ( $5 < \text{pH} < 10$ ).

Lee et al. ont proposé une méthode originale impliquant une étape unique, durant laquelle ont lieu simultanément la fonctionnalisation de la silice, le greffage et la réticulation du polymère en présence d'un amorceur de radicaux libres (peroxyde de cumyle) [76, 77]. Différents polymères (polyéthers, HPC et PEI) ont pu être greffés par ce principe, conduisant à des revêtements stables et reproductibles permettant de séparer efficacement des protéines basiques ou des fragments peptidiques [77].

Une autre voie de modification par greffage chimique consiste à polymériser in-situ un monomère hydrophile à l'intérieur du capillaire. Cette méthode, initialement utilisée par Hjerten [78], comporte deux étapes : (1) greffage sur la paroi du capillaire d'un composé vinylique ou acrylique puis (2) copolymérisation d'un monomère hydrophile avec les groupements insaturés liés à la paroi. Ce procédé aboutit à la formation de couches monomoléculaires de polymère greffées à la surface du capillaire. La polymérisation in-situ de l'acrylamide a ainsi été réalisée en milieu aqueux, après traitement du capillaire par le  $\gamma$ -méthacryloxypropyltriméthoxysilane (MAPS), un silane insaturé permettant de lier le polymère à la paroi par des ponts siloxanes Si-O-Si-C. D'autres polymères ont été greffés in-situ par l'intermédiaire du MAPS, comme la vinylpyrrolidone (VP) [23] ou des copolymères de VP et de vinylimidazole (VI) [79].

Le principal inconvénient à l'utilisation des silanes pour le prétraitement du capillaire est l'hydrolyse, à pH élevé, des ponts siloxane reliant le polymère à la paroi du capillaire [50]. Cependant, la formation de couches orientées d'alcényltriméthoxysilanes génère des

monocouches auto-assemblées d'alkylsilane stables en milieu basique, les ponts siloxane étant protégés par le film hydrophobe [80, 81]. Il est également possible d'effectuer un autre type de modification des silanol permettant de greffer un composé vinylique à la surface du capillaire via des liaisons Si-C stables par l'intermédiaire d'une réaction de Grignard [82]. La polymérisation in-situ du polymère est ensuite réalisée en milieu aqueux par un procédé similaire à celui de Hjerten [78].

La résistance du polymère immobilisé à l'hydrolyse est également un paramètre essentiel. Afin de pallier ce manque de stabilité en milieu basique des fonctions amide du polyacrylamide, des revêtements de polyacrylamide N-substitué, plus résistants à l'hydrolyse, ont été greffés sur la paroi de silice par l'intermédiaire de liaisons Si-C [83, 84]. Cette méthode permet d'améliorer la reproductibilité de l'analyse des protéines acides à pH 8,5 et de doubler le temps de vie des capillaires obtenus.

Les progrès réalisés dans les procédés de traitement de surface des capillaires de silice ont abouti à la commercialisation de capillaires prétraités, avec modification permanente de la surface de silice. Cependant, le manque de stabilité de ces capillaires commerciaux, ainsi que leur coût prohibitif limitent encore leur usage pour l'étude par électrophorèse capillaire des protéines.

### 3. Caractérisation du lysozyme par électrophorèse capillaire de zone (CZE)

Du fait de sa forte basicité ( $pI > 11$ ), le lysozyme est chargé positivement à pH neutre. Son analyse dans un capillaire en silice vierge est donc impossible : en effet, la déprotonation des groupements silanol fait apparaître des charges négatives sur la paroi du capillaire, conduisant ainsi à une adsorption totale de la protéine par interaction électrostatique (Figure 56A). Plusieurs stratégies ont donc été mises en œuvre afin de limiter l'adsorption du lysozyme et de permettre ainsi sa détection.

L'appareillage utilisé est un système HP<sup>3D</sup>CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne) équipé d'un détecteur à barrette de diodes. Les données sont traitées à l'aide du logiciel HPChemstation.

#### 3. 1. Influence du pH de l'électrolyte de séparation

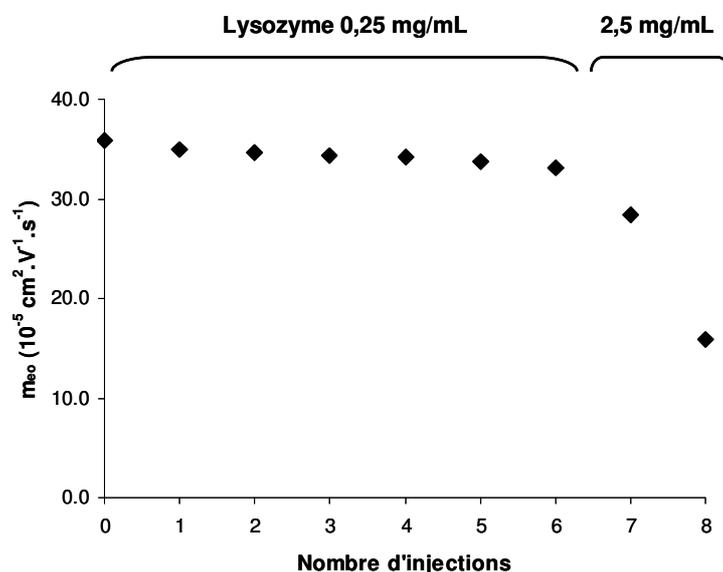
L'écoulement électroosmotique régnant dans un capillaire en silice vierge dépend du pH de l'électrolyte de séparation selon une relation de type sigmoïde [85]. A pH acide, les groupements silanol de surface sont protonés, ce qui conduit à une mobilité électroosmotique quasi-nulle. Lorsque le pH augmente, les silanols sont progressivement ionisés, entraînant une augmentation du flux électroosmotique jusqu'à une valeur plateau correspondant à l'ionisation totale des fonctions silanol.

##### 3.1.1. Analyse du lysozyme à pH acide

Une première stratégie consiste donc à diminuer le pH de l'électrolyte de séparation (BGE) afin de limiter la déprotonation des groupements silanol ( $pK_a \sim 5 - 6$ ), ce qui se traduit notamment par une diminution sensible du flux électroosmotique.

L'injection séquentielle d'une solution aqueuse de lysozyme (0,25 ou 2,5 mg/mL) et d'un marqueur neutre, le diméthylformamide (0,05 % v/v) a donc été réalisée dans un tampon formiate de sodium de pH 3,3 et de force ionique 30 mM. Une tension positive a été appliquée afin de permettre la migration des composés. Les électrophérogrammes obtenus présentent un pic unique à 200 et 214 nm, mais aucun signal n'est observé à 280 nm

(longueur d'onde d'absorption maximale des protéines, du fait de la présence d'acides aminés aromatiques). Le lysozyme n'est donc pas détecté, le pic observé est attribué au marqueur neutre. A force ionique identique, le flux électroosmotique à pH 3,3 ( $m_{eo} \sim 35 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) présente une diminution d'environ 30 % par rapport celui observé à pH 7,2 ( $m_{eo} \sim 50 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , tampon phosphate de sodium). Ceci traduit une protonation partielle des silanols, cependant insuffisante pour empêcher l'interaction avec le lysozyme. Au cours des injections successives, une diminution progressive du flux électroosmotique est observée (Figure 55), ce qui confirme l'adsorption du lysozyme sur la paroi du capillaire : en effet, les charges négatives des silanols sont masquées par les charges positives du lysozyme, ce qui conduit à une diminution du flux. Cette diminution est d'autant plus rapide et importante que la concentration de la solution de lysozyme injectée augmente : après seulement deux injections de lysozyme à 2,5 mg/mL, le flux observé présente une diminution de plus de 50% par rapport au flux initial. Le lavage du capillaire à l'aide de solutions de soude 1 M et 0,1 M puis de méthanol n'a pas permis de retrouver les valeurs de flux initiales, ce qui traduit l'irréversibilité de l'adsorption de la protéine sur la paroi. Une diminution plus drastique du pH de l'électrolyte, qui conduirait à une protonation plus importante des silanols, n'est pas envisageable car susceptible d'entraîner une dénaturation de la protéine.



**Figure 55 : évolution du flux électroosmotique au cours des injections successives de lysozyme.** Capillaire en silice vierge : 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Electrolyte de séparation : formiate de sodium 30 mM, pH 3,3. Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Echantillon : solution aqueuse de lysozyme 0,25 ou 2,5 mg/mL. Injection hydrodynamique : échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s), MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +15 kV. Température : 25°C.

### 3.1.2. Analyse du lysozyme à pH basique

Une autre stratégie consiste à augmenter le pH de l'électrolyte afin de diminuer la charge nette de la protéine. L'injection séquentielle d'une solution de lysozyme à 0,25 mg/mL (dilué dans l'électrolyte de séparation) et de diméthylformamide (0,05 % v/v) a donc été réalisée dans un tampon formiate d'ammonium de pH 10,0 et de force ionique 30 mM. Une tension positive a été appliquée afin de permettre la migration des composés. Comme précédemment, seul le pic correspondant au marqueur neutre a été observé, parallèlement à une diminution du flux électroosmotique (de 63,9 à  $56,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , soit une diminution de plus de 10% après une seule injection) : le lysozyme injecté est donc totalement adsorbé sur la paroi interne du capillaire.

Ainsi, l'emploi de pH extrêmes n'a pas permis d'observer le lysozyme dans un capillaire en silice vierge, du fait de sa forte adsorption sur la paroi de silice.

## 3. 2. Modification de la paroi du capillaire

Une autre méthode pour minimiser l'adsorption protéique consiste à modifier la paroi du capillaire de façon à masquer les charges négatives des silanols, en général à l'aide d'un polymère. Différentes modifications permanentes ou dynamiques via des polymères neutres (Figure 56B) ou cationiques (Figure 56C) ont donc été évaluées.

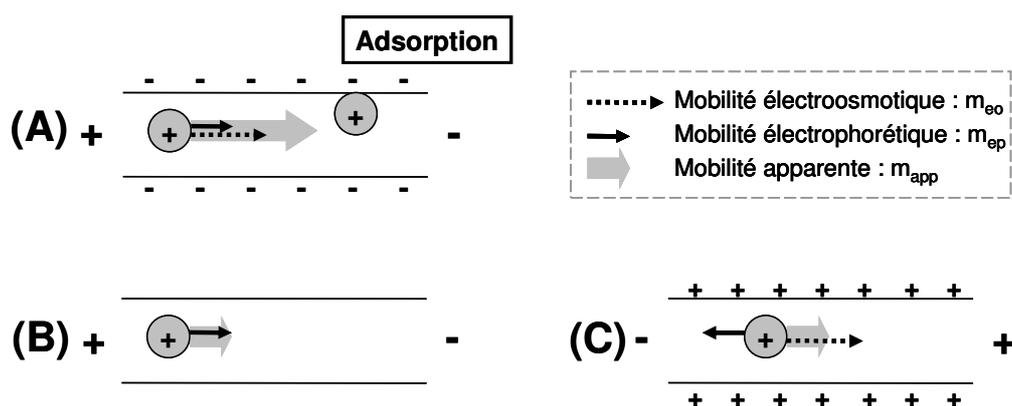


Figure 56 : représentation schématique de l'analyse du lysozyme à pH neutre dans un capillaire en silice vierge (A) ou modifié par un polymère neutre (B) ou cationique (C) dans un électrolyte de pH proche de 7.

### 3.2.1. Modification dynamique

#### 3.2.1.1. Modification dynamique par un polymère cationique, le polybrène

Une modification dynamique du capillaire a été réalisée à l'aide d'un polymère cationique, le bromure d'hexadiméthrine, ou polybrène (PB) (Figure 57).

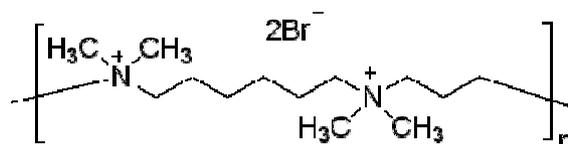
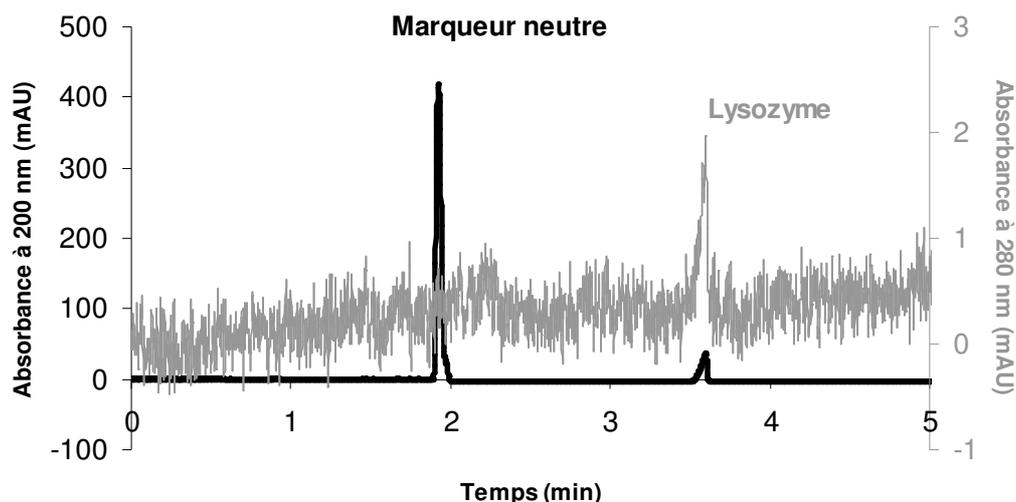


Figure 57 : structure du bromure d'hexadiméthrine, ou polybrène (PB)

La modification du capillaire (diamètre interne 50  $\mu\text{m}$ , longueur totale 35 cm) est effectuée en début de journée selon le protocole de rinçage suivant (sous une pression de 935 mbar) : soude 1 M (15 min), soude 0,1 M (15 min), eau ultrapure (5 min), solution aqueuse de PB 0,3 g/L (15 min), eau ultrapure (5 min) et électrolyte de séparation (10 min). L'adsorption du polymère chargé positivement sur la surface du capillaire entraîne une inversion du flux électroosmotique (Figure 56C) : dans le phosphate de sodium 30 mM (pH 7,2) un flux anodique d'environ  $-30 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  est généré, au lieu du flux cathodique classiquement observé en silice vierge dans les mêmes conditions ( $m_{\text{eo}} \sim 50 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Une tension négative doit donc être appliquée afin de visualiser la migration du marqueur neutre. L'injection d'une solution aqueuse de lysozyme à 0,25 mg/mL entraîne l'apparition d'un pic de mobilité  $m_{\text{ep}} = 14,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $n = 3$ ) compatible avec les valeurs trouvées dans la littérature pour le lysozyme [86], et dont l'absorbance à 280 nm est caractéristique d'une protéine (Figure 58) : il s'agit donc du lysozyme. La présence de charges positives sur la paroi du capillaire permet ainsi de minimiser les interactions avec la protéine basique, par le biais de la répulsion électrostatique engendrée, et d'observer ainsi la migration du lysozyme en mode contre-électroosmotique. Un très léger décalage de la ligne de base est parfois observé après le signal du lysozyme, traduisant l'existence d'une adsorption résiduelle visualisée au niveau de la fenêtre de détection. La triangularisation du signal provient de la différence de mobilité entre le lysozyme ( $m_{\text{ep}} \sim 15 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et le co-ion de l'électrolyte (sodium,  $m_{\text{ep}} \sim 50 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), via un phénomène de préconcentration.

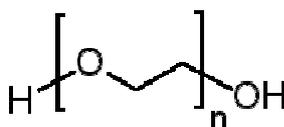


**Figure 58 :** profil électrophorétique obtenu lors de l'injection d'une solution aqueuse de lysozyme dans un capillaire modifié dynamiquement par le polybrène (PB). Longueur d'onde de détection : 200 nm (noir) et 280 nm (gris). Capillaire modifié PB : 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30 mM (pH 7,2). Marqueur neutre : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Echantillon : solution aqueuse de lysozyme 0,25 mg/mL. Injection hydrodynamique : marqueur neutre (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : -25 kV. Température : 25°C.

La modification de la surface du capillaire par le polybrène permet donc une analyse satisfaisante du lysozyme, ce qui donne accès à sa mobilité électrophorétique. Cependant, la présence de charges positives sur la paroi du capillaire est incompatible avec l'analyse de l'aptamère ; en effet, celui-ci présente une charge négative à pH neutre, du fait de la déprotonation des groupements phosphates présents sur chaque base nucléique, et s'adsorbe donc sur la surface par le biais d'interactions électrostatiques. L'emploi d'un modificateur cationique est par conséquent inadapté à l'étude du système lysozyme/aptamère. Seul un modificateur neutre pourra être employé, car compatible à la fois avec le lysozyme (chargé positivement) et l'aptamère (chargé négativement).

### 3.2.1.2. Modification dynamique par un polymère neutre, l'oxyde de polyéthylène

Une modification dynamique à l'aide d'un polymère neutre, l'oxyde de polyéthylène (PEO) (Figure 59) a également été mise en œuvre suivant plusieurs modes opératoires.



**Figure 59 :** structure de l'oxyde de polyéthylène (PEO)

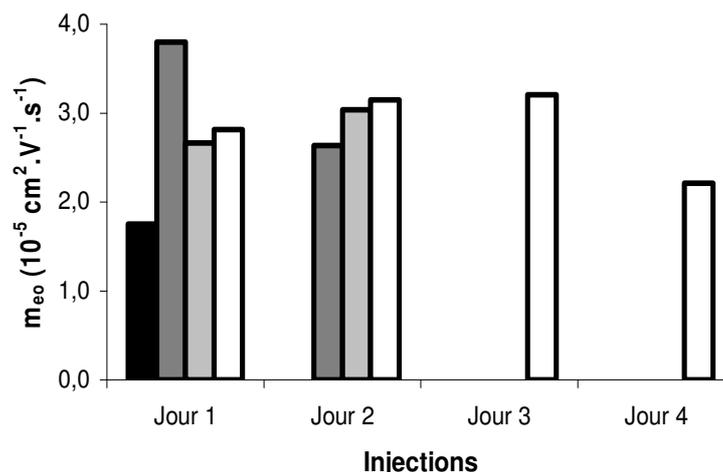
L'interaction entre le PEO et la paroi de silice s'effectuant via des liaisons hydrogène avec les groupements silanols protonés, il est nécessaire d'introduire une étape de rinçage par une solution acide et d'acidifier la solution aqueuse de PEO afin de favoriser la protonation des silanols et d'assurer ainsi l'efficacité et la stabilité du revêtement. Plusieurs protocoles de modification, décrits dans le Tableau 5, ont été évalués. Il est à noter que les protocoles développés dans la littérature pour l'analyse de protéines basiques [54, 87] (protocoles 1 et 2) n'ont pas été évalués vis-à-vis de la caractérisation du lysozyme.

**Tableau 5 : description des différents protocoles de modification dynamique à l'aide du PEO.** Les temps indiqués correspondent aux temps de rinçage, sous une pression de 935 mbar.

	<b>n°1</b> (développé par Fermas et al. [54])		<b>n°2</b> (adapté d'après Tran et al. [87])		<b>n°3</b> (proposé par Daniel et al. *)		<b>n°4</b> (adapté d'après Daniel et al. *)	
<b>Activation</b>	eau	15 min	eau	2 min				
	NaOH 1M	15 min	NaOH 1M	5 min				
	HCl 1M	15 min	eau	2 min				
	eau	15 min	HCl 1M	5 min				
			eau	2 min				
		BGE	5 min					
<b>Modification</b>	eau	2 min	eau	3 min	eau	5 min	eau	2 min
	HCl 1M	10 min	HCl 1M	3 min	NaOH 1M	15 min	NaOH 1M	5 min
	PEO 0,2 mg/mL dans HCl 0,1M	15 min	PEO 0,02% dans HCl 0,1M	5 min	eau	15 min	eau	5 min
					air	15 min	air	5 min
	BGE	5 min	BGE	5 min	NaOH 1M	10 min	NaOH 1M	3 min
					HCl 1M	15 min	HCl 1M	5 min
					PEO 0,02% dans HCl 0,1M	15 min	PEO 0,02% dans HCl 0,1M	10 min
				BGE	8 min	BGE	8 min	
<b>Post-condi. / Régénér.</b>	eau	5 min			eau	3 min	eau	3 min
	NaOH 0,1M	5 min			HCl 1M	3 min	HCl 1M	3 min
	eau	5 min			PEO 0,02% dans HCl 0,1M	5 min	PEO 0,02% dans HCl 0,1M	5 min
					BGE	5 min	BGE	5 min

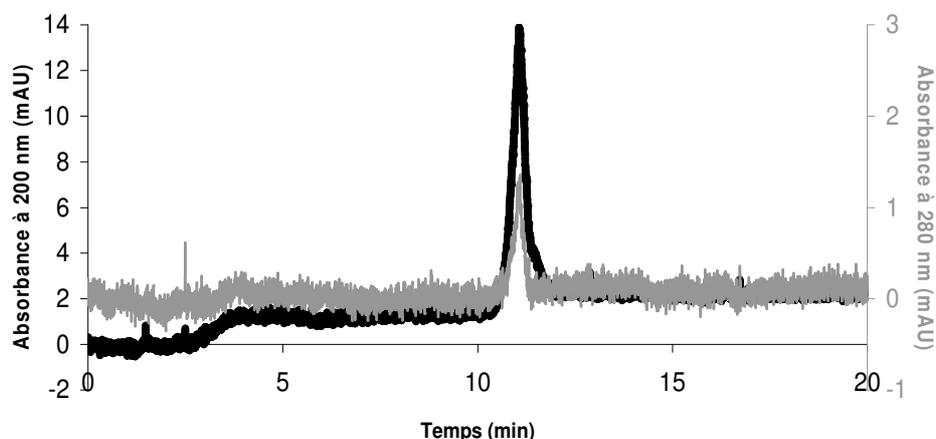
\* Université d'Evry-Val-d'Essonne, Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement (CNRS UMR 8587), F-91025 Evry, France

Dans un électrolyte phosphate de sodium 30 mM (pH 7,2), la mobilité électroosmotique obtenue par injection d'un marqueur neutre à l'issue des protocoles 1 et 2 est de l'ordre de  $2-3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , contre environ  $50 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  en silice vierge, soit une réduction d'environ un ordre de grandeur. Cette diminution très sensible du flux électroosmotique traduit donc un écrantage efficace des charges négatives de la paroi de silice par le PEO. De plus, la répétabilité intra- et inter-journalière des mesures de flux est satisfaisante (Figure 60), ce qui reflète la stabilité du revêtement.



**Figure 60 : répétabilité intra- et inter-journalière du flux électroosmotique obtenu après modification dynamique par le PEO.** Capillaire modifié PEO (protocole n°2) : 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30 mM (pH 7,2). Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +15 kV. Température : 25°C.

L'injection du lysozyme conduit à l'apparition d'un signal présentant une absorbance à 280 nm (Figure 61), mais correspondant à une mobilité électrophorétique de l'ordre de  $1.10^{-5} \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$ , soit un ordre de grandeur plus faible que celle attendue d'après les valeurs trouvées dans la littérature et les résultats obtenus en capillaire modifié par le polybrène.

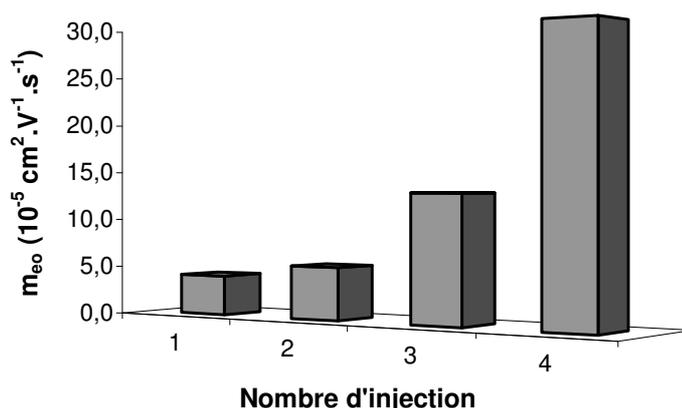


**Figure 61 : profil électrophorétique obtenu lors de l'injection d'une solution aqueuse de lysozyme dans un capillaire modifié dynamiquement par le PEO.** Longueur d'onde de détection : 200 nm (noir) et 280 nm (gris). Capillaire modifié PEO (protocole n°2) : 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30 mM (pH 7,2). Echantillon : solution aqueuse de lysozyme 0,5 mg/mL. Injection hydrodynamique : échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +15 kV. Température : 25°C.

Cette trop faible mobilité peut s'expliquer par l'existence d'interactions entre le lysozyme et le PEO, notamment via la formation de liaisons hydrogènes. L'augmentation du pH de l'électrolyte conduit à une augmentation du flux électroosmotique résiduel à partir de pH 8 :  $m_{eo} = 6,0 \pm 0,0.10^{-5} \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$  ( $n = 3$ ) dans un électrolyte Tris-HCl 30 mM (pH 8,1) ( $m_{eo} =$

$49,6 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  en silice vierge). En milieu fortement basique ( $\text{pH} > 10$ ), la mobilité électroosmotique devient quasi-identique à celle observée en silice vierge, ce qui traduit l'inefficacité de la modification par le PEO :  $m_{\text{eo}} \sim 59 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  dans le formiate d'ammonium 30 mM ( $\text{pH} 10,0$ ) ( $m_{\text{eo}} \sim 61 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  en silice vierge). En effet, un  $\text{pH}$  trop élevé conduit à une déprotonation importante des groupements silanols de la paroi, défavorisant ainsi l'interaction avec le PEO via des liaisons hydrogènes. Ces résultats corroborent les observations de Yeung et al. selon lesquelles la modification par le PEO perdait de son efficacité au-delà de  $\text{pH} 7,7$  [53].

Un troisième protocole de modification (protocole n°3), proposé par l'équipe de R. Daniel (Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement, Evry), a donc été testé. Afin d'étudier la stabilité du revêtement, plusieurs mesures de flux successives sont réalisées après l'étape de modification (Figure 62). Comme observé avec les protocoles n°1 et n°2, le flux électroosmotique est fortement réduit, sans être toutefois totalement supprimé ( $m_{\text{eo}} = 4,1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  après la modification) ; en outre, il augmente rapidement au cours des analyses successives ( $m_{\text{eo}} = 29,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  après 4 analyses). Une étape de régénération, inspirée du protocole n°2, est donc effectuée : eau ultrapure (3 min), HCl 1 M (3 min), solution de PEO à 0,02% (w/v) dans HCl 0,1 M (5 min) puis électrolyte de séparation (5 min). Cependant, le flux résiduel obtenu après régénération ( $m_{\text{eo}} = 10,1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) reste supérieur à celui observé immédiatement après la première modification.

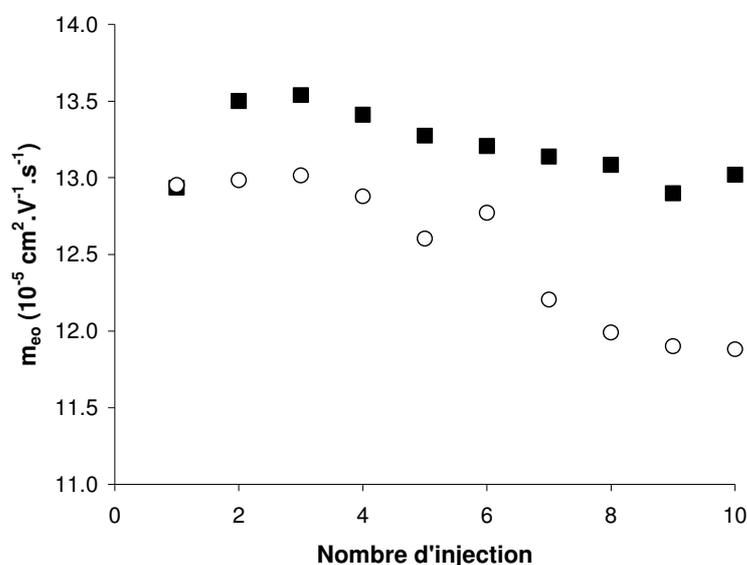


**Figure 62 : stabilité du flux électroosmotique résiduel obtenu après modification dynamique par le PEO.** Capillaire modifié PEO (protocole n°3) : 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30 mM ( $\text{pH} 7,2$ ). Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 30 s). Migration électrophorétique : +15 kV. Température : 25°C.

Dans la suite de cette étude, le protocole de modification n°3, optimisé pour un capillaire de 1 m de longueur totale, a été adapté à la longueur du capillaire utilisé (35 cm de

longueur totale) en divisant les temps par trois, sauf pour le rinçage avec la solution de PEO, de viscosité plus élevée. Le protocole modifié est appelé protocole n°4 (Tableau 5).

Afin de tester la répétabilité de la modification via ce protocole, une série de modifications suivies d'une mesure de flux selon la méthode de William et Vigh [88] a été réalisée (Figure 63, ■). Le flux électroosmotique résiduel est  $m_{eo} = 13,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $n = 10$ ). La répétabilité de l'étape de régénération a également été étudiée grâce à une répétition de simples régénérations suivies d'une mesure de flux (Figure 63, ○). Le flux électroosmotique résiduel est  $m_{eo} = 12,5 \pm 0,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $n = 10$ ). L'ordre de grandeur du flux électroosmotique résiduel est donc le même, que ce soit pour la modification ou la régénération. Dans les deux cas, malgré une répétabilité satisfaisante ( $\text{CV} < 5\%$ ), on note une légère tendance à la diminution du flux, qui pourrait s'expliquer par la formation de multicouches de polymère, entraînant un meilleur écrantage des charges de surface du capillaire. La répétabilité est légèrement plus faible pour la régénération ( $\text{CV} = 3,8\%$ ) que pour la modification complète ( $\text{CV} = 1,7\%$ ), ce qui pourrait traduire une formation plus rapide de multicouches, notamment du fait de l'absence de rinçage basique pour désorber le PEO de la surface de silice.



**Figure 63 : répétabilité du flux électroosmotique résiduel obtenu après modification dynamique par le PEO (■) ou régénération (○).** Capillaire modifié PEO (protocole n°4) : 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30 mM (pH 7,2). Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 30 s), MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 30 s). Migration électrophorétique : +15 kV, 2 min. Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s). Percolation : 30 mbars. Température : 25°C.

Ainsi, la modification dynamique de la surface du capillaire par le PEO présente un certain nombre d'inconvénients (écoulement électroosmotique résiduel non négligeable,

formation de multicouches, mobilité très faible des protéines due à une possible interaction) qui ne permettent pas d'envisager son utilisation pour l'analyse du lysozyme.

### 3.2.2. Modification permanente par un polymère neutre

La surface du capillaire peut également être modifiée de façon permanente par adsorption d'une fine couche de polymère. Des capillaires greffés par deux polymères neutres, l'hydroxypropylcellulose (HPC) et le poly(vinyl)alcool (PVA), ainsi que des capillaires commerciaux greffés par le diméthylpolysiloxane (DB-1) ont ainsi été évalués.

#### 3.2.2.1. Modification permanente par l'hydroxypropylcellulose

La modification du capillaire par un dérivé cellulosique neutre, l'hydroxypropylcellulose (HPC) (Figure 64), a été évaluée et optimisée pour l'analyse du lysozyme.

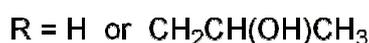
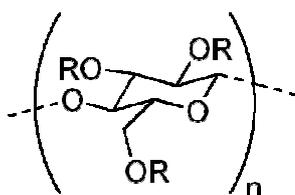


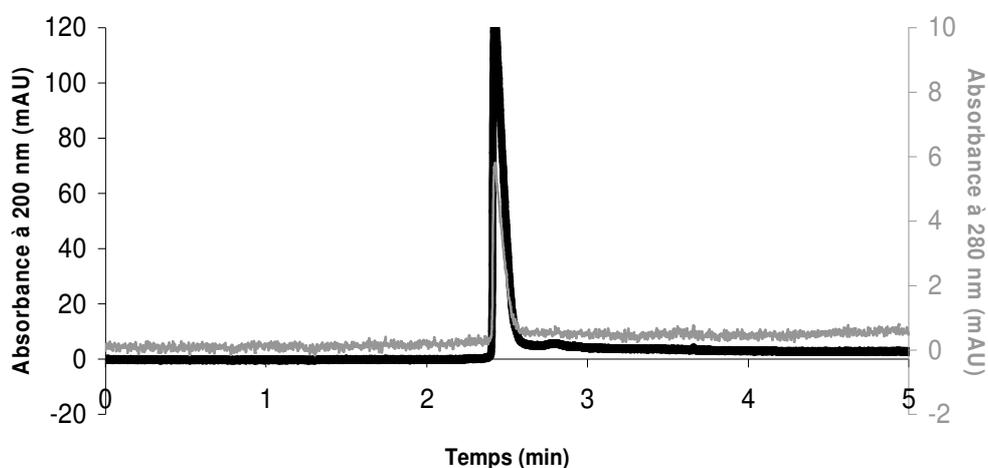
Figure 64 : structure de l'hydroxypropylcellulose (HPC)

##### 3.2.2.1.1. Description de la procédure de greffage

Le greffage du capillaire s'effectue par adsorption physique suivi d'une réticulation thermique, selon la procédure développée par Shen et al. [64]. 10  $\mu\text{L}$  d'une solution aqueuse de HPC (5 g / 100 mL) sont percolés dans le capillaire à un débit de 0,5  $\mu\text{L}/\text{min}$  à l'aide d'un pousse-seringue. Le capillaire est ensuite placé sous un flux d'azote (4 bars) afin d'éliminer le polymère en excès, chauffé dans un four de chromatographie gazeuse (GC) de 60 à 140°C à 5°C/min, puis cuit pendant 20 min à 140°C, toujours sous flux d'azote. Après refroidissement (10°C/min), la fenêtre de détection est réalisée en brûlant la gaine de polyimide. L'écoulement électroosmotique résiduel est mesuré par la méthode de Williams et Vigh [88].

### 3.2.2.1.2. Analyse du lysozyme en capillaire greffé HPC

Un premier capillaire (capillaire n°1) a été modifié selon ce protocole, puis une série de mesures de flux a été réalisée dans le tampon phosphate de sodium 30 mM (pH 7,2). Le flux électroosmotique résiduel est négligeable ( $m_{eo} = 5 \pm 2.10^{-7} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$ ,  $n = 10$ ), ce qui permet notamment d'assimiler la mobilité apparente d'un composé à sa mobilité électrophorétique. L'injection d'une solution aqueuse de lysozyme à 1 mg/mL conduit à l'apparition d'un pic dont la mobilité électrophorétique,  $m_{ep} = 13,7 \pm 0,0.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$  ( $n = 4$ ), est similaire à celle observée pour le lysozyme en capillaire modifié PB, dans les mêmes conditions (Figure 65). Le greffage HPC réalisé permet ainsi la détection du lysozyme grâce à un écrantage efficace des charges négatives de la surface de silice. L'absence de retour complet à la ligne de base semble toutefois indiquer l'existence d'une légère adsorption résiduelle. La dissymétrie du pic est vraisemblablement la conséquence de la différence de mobilité entre le lysozyme et le co-ion de l'électrolyte (sodium), selon un phénomène identique à celui observé en capillaire modifié PB ; l'inversion du sens de triangularisation est due au passage d'un mode contre-électroosmotique (capillaire PB) à un mode faiblement co-électroosmotique (capillaire HPC).



**Figure 65 : profil électrophorétique obtenu lors de l'injection d'une solution aqueuse de lysozyme dans un capillaire modifié de façon permanente par HPC.** Longueur d'onde de détection : 200 nm (noir) et 280 nm (gris). Capillaire modifié HPC n°1 (Figure 66): 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30 mM (pH 7,2). Echantillon : solution aqueuse de lysozyme 1 mg/mL. Injection hydrodynamique : échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +15 kV. Température : 25°C.

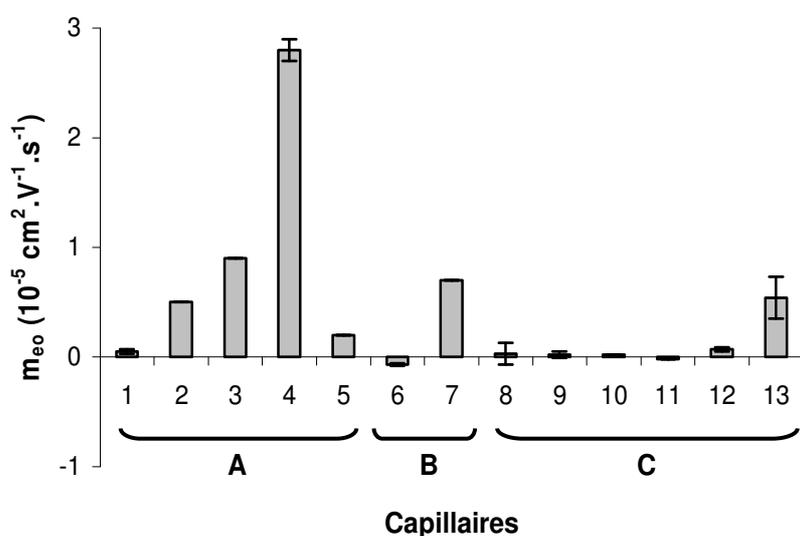
### 3.2.2.1.3. Durée de vie et stockage des capillaires greffés HPC

Une légère augmentation du flux résiduel cathodique est observée au cours des analyses successives. Celle-ci ne peut être imputée à l'adsorption du lysozyme, puisque celui-ci est chargé positivement et conduirait donc à une diminution de l'écoulement

électroosmotique. Ce phénomène est plus vraisemblablement causé par la désorption progressive du polymère ; celle-ci semble donner lieu à la formation d'agrégats, qui se traduit par l'apparition de signaux très fins ou « spikes » hérissant la ligne de base des électrophérogrammes obtenus et correspondant au passage de ces agrégats devant la fenêtre de détection. Ainsi, les capillaires modifiés ne sont utilisables que pendant quelques jours, 3 ou 4 au maximum. La conservation des capillaires greffés est également problématique : en effet, ceux-ci doivent être conservés en milieu hydraté (eau ou tampon), car le stockage à l'air conduit à une augmentation très sensible du flux résiduel (de 0,3 à 4,3.  $10^{-5}$   $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  après 48h de stockage à l'air du capillaire n°1), traduisant une dégradation importante du revêtement HPC.

#### 3.2.2.1.4. Répétabilité et optimisation du greffage HPC

Du fait de la faible durée de vie du revêtement HPC, de nouveaux capillaires greffés doivent être préparés régulièrement. Or, le protocole décrit précédemment présente une assez mauvaise répétabilité qui se traduit par l'hétérogénéité des valeurs de flux résiduel mesurées juste après greffage (Figure 66A).



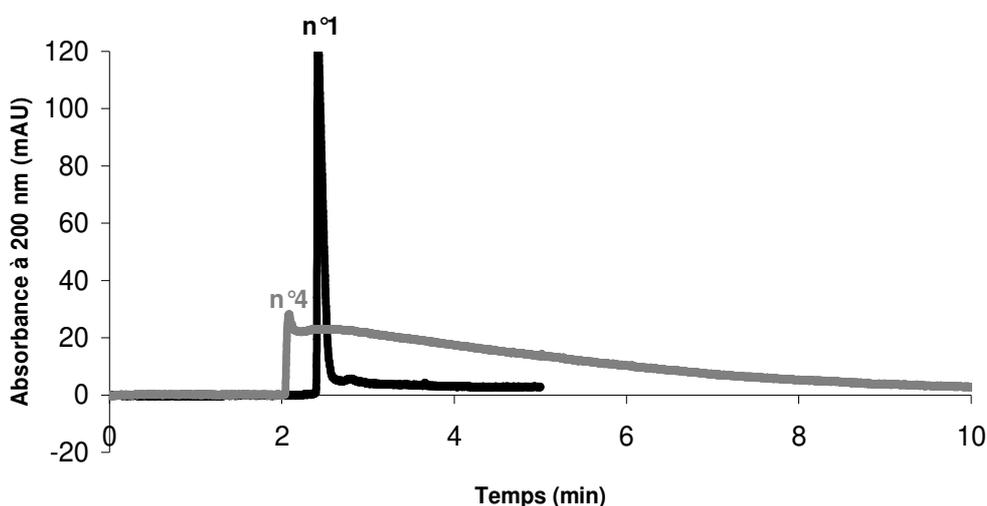
**Figure 66 : mobilité électroosmotique résiduelle de différents capillaires après greffage HPC effectué selon différentes conditions :** procédure de base (A), avec 1h d'incubation et réalisation de la fenêtre par retrait de la gaine de polyimide à la lame (B) ou avec percolation à un débit de 0,25  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 2h d'incubation et réalisation de la fenêtre par retrait de la gaine de polyimide à la lame (C). Capillaire modifié HPC : 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30 mM (pH 7,2). Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 30 s), MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 30 s). Migration électrophorétique : +15 kV, 2 min. Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s). Percolation : 30 mbars. Température : 25°C.

En particulier, le flux résiduel n'est pas toujours négligeable, ce qui conduit à une plus forte adsorption du lysozyme sur la paroi du capillaire et donc à une dégradation du profil

électrophorétique, qui présente une importante traînée d'adsorption (Figure 67). Afin de pallier ce problème, une optimisation des conditions de greffage a été réalisée. Trois points ont permis d'améliorer l'efficacité du greffage :

- (i) diminution du débit de percolation de la solution aqueuse de HPC : 0,25  $\mu\text{L}/\text{min}$  (au lieu de 0,5  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) ;
- (ii) introduction d'une étape d'incubation (entre 2 et 16h) après percolation de la solution aqueuse de HPC, afin de favoriser l'adsorption physique du polymère ;
- (iii) réalisation de la fenêtre par retrait de la gaine de polyimide à l'aide d'une lame (au lieu de la brûler) afin d'éviter l'exposition à une source de chaleur, susceptible de dégrader le polymère.

Ces conditions optimisées ont permis d'obtenir des capillaires présentant un écoulement résiduel négligeable, de façon nettement plus répétable (Figure 66C).

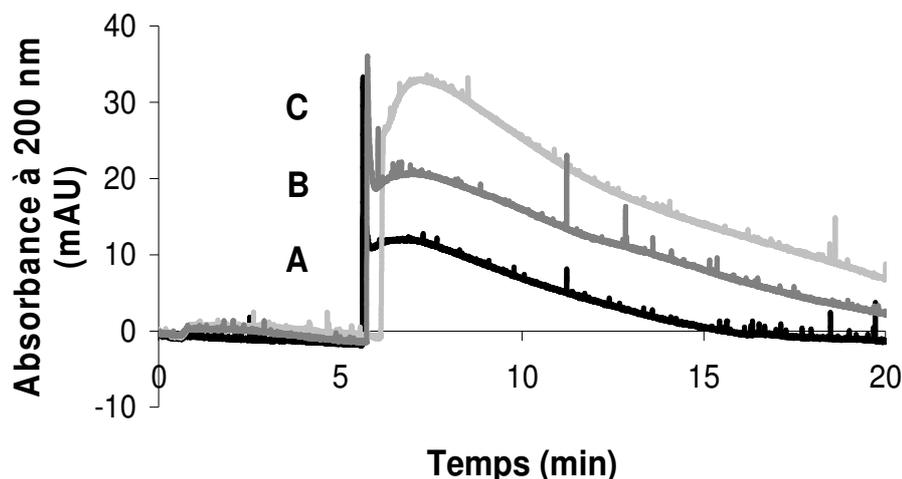


**Figure 67 : profils électrophorétiques obtenus lors de l'injection d'une solution aqueuse de lysozyme dans deux capillaires modifiés de façon permanente par HPC (procédure de base).** Capillaire n°1 :  $m_{eo} = 5 \pm 2.10^{-7} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$  ( $n = 10$ ) ;  $m_{ep} = 13,7 \pm 0,0.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$  ( $n = 4$ ). Capillaire n°4 :  $m_{eo} = 2,8 \pm 0,1.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$  ( $n = 3$ ) ;  $m_{ep} = 13,1 \pm 0,2.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$  ( $n = 3$ ). Capillaire modifié HPC n°1 ou n°4 (Figure 66) : 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30 mM, pH 7,2. Echantillon : solution aqueuse de lysozyme 1 mg/mL. Injection hydrodynamique : échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +15 kV. Température : 25°C. Longueur d'onde de détection : 200 nm.

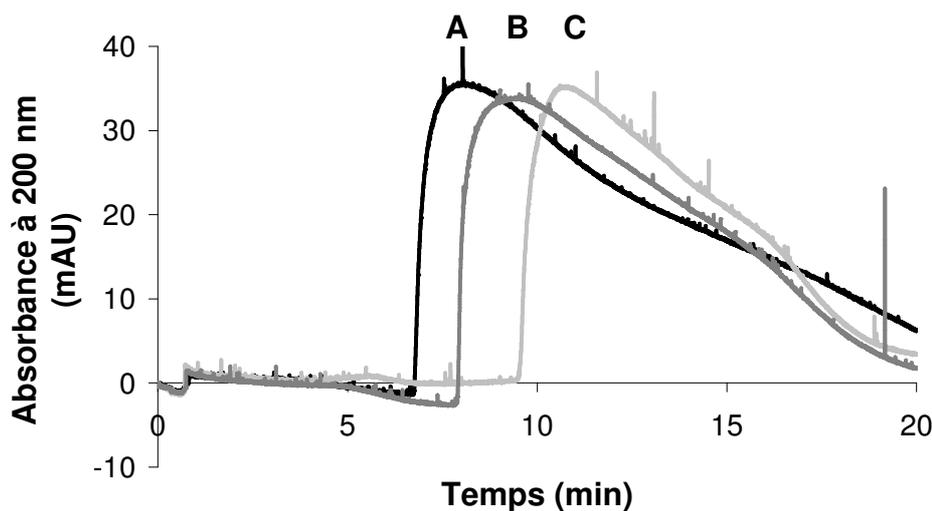
### 3.2.2.1.5. Désorption du lysozyme adsorbé

L'adsorption résiduelle du lysozyme sur la paroi du capillaire peut être divisée en deux phénomènes distincts : une adsorption dite réversible, qui se traduit par l'existence d'une traînée d'adsorption, et une adsorption irréversible, qui entraîne un décalage de la ligne de base vers le haut. Il en résulte un fond d'absorbance qui conduit à une diminution de la sensibilité au cours des analyses successives, ainsi qu'une diminution de la mobilité

électrophorétique du lysozyme, du fait de l'interaction avec le lysozyme adsorbé en surface. Afin d'éliminer le lysozyme adsorbé à la surface du capillaire, une étape de lavage acide a été introduite en fin d'analyse, suivant le protocole de rinçage suivant : eau ultrapure (2 min), HCl 1 mM (5 min), eau ultrapure (2 min). Afin d'évaluer l'effet de ce post-conditionnement, des injections de lysozyme 0,25 mg/mL suivies chacune d'une mesure de flux ont été effectuées, avec (Figure 68) ou sans étape de post-conditionnement (Figure 69).

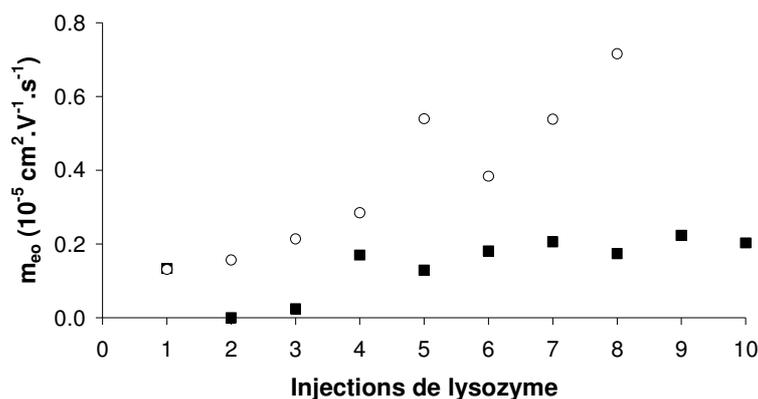


**Figure 68 : profils électrophorétiques obtenus lors d'injections successives du lysozyme dans un capillaire greffé HPC avec post-conditionnement HCl 1 mM :** 1<sup>ère</sup> injection (A), 4<sup>ème</sup> injection (B) et 10<sup>ème</sup> injection (C). Capillaire modifié HPC n°10 (conditions optimisées) : 50  $\mu$ m de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM (pH 7,0). Echantillon : solution aqueuse de lysozyme 0,25 mg/mL. Injection hydrodynamique : échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +20 kV. Température : 25°C. Longueur d'onde de détection : 200 nm. Post-conditionnement : eau (2 min), HCl 1 mM (5 min), eau (2 min).



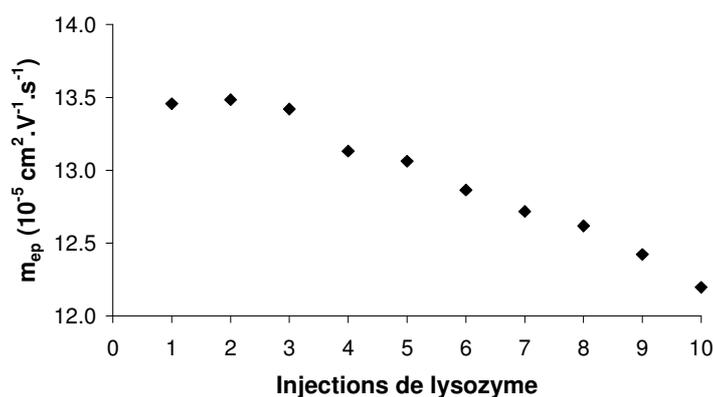
**Figure 69 : profils électrophorétiques obtenus lors d'injections successives du lysozyme dans un capillaire greffé HPC sans post-conditionnement :** 1<sup>ère</sup> injection (A), 2<sup>ème</sup> injection (B) et 3<sup>ème</sup> injection (C). Capillaire modifié HPC n°10 (conditions optimisées) : 50  $\mu$ m de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM (pH 7,0). Echantillon : solution aqueuse de lysozyme 0,25 mg/mL. Injection hydrodynamique : échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +20 kV. Température : 25°C. Longueur d'onde de détection : 200 nm. Post-conditionnement : aucun.

L'introduction du lavage acide permet d'améliorer l'allure des profils électrophorétiques, bien que l'on observe une augmentation non expliquée de l'aire globale du massif au cours des injections successives. En outre, le rinçage avec HCl 1 mM ne semble pas entraîner d'altération supplémentaire du greffage ; au contraire, le flux résiduel augmente moins rapidement qu'en l'absence de post-conditionnement (Figure 70), ce qui reflète une meilleure stabilité du revêtement dans ces conditions.



**Figure 70 : évolution de la mobilité électroosmotique résiduelle mesurée entre des injections successives de lysozyme avec post-conditionnement HCl 1 mM de 5 minutes (■) ou sans post-conditionnement (○).** Capillaire modifié HPC n°10 (conditions optimisées) : 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM (pH 7,0). Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 30 s), MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 30 s). Migration électrophorétique : +15 kV, 3 min. Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s). Percolation : 30 mbars. Température : 25°C.

La mobilité électrophorétique du lysozyme diminue régulièrement au cours des analyses successives (diminution d'environ 10% entre la première et la 10<sup>ème</sup> injection) (Figure 71), ce qui montre que l'adsorption irréversible n'est pas totalement supprimée.

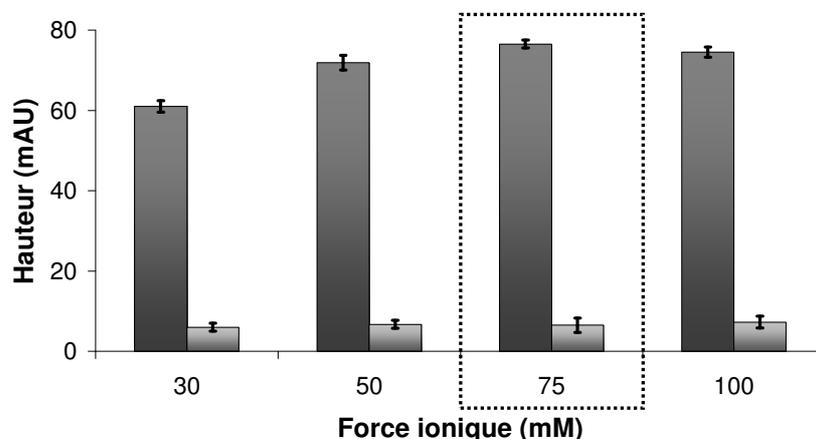


**Figure 71 : évolution de la mobilité électrophorétique du lysozyme au cours d'injections successives avec post-conditionnement HCl 1 mM de 5 minutes.** Capillaire modifié HPC n°10 (conditions optimisées) : 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, pH 7,0. Echantillon : solution aqueuse de lysozyme 0,25 mg/mL. Injection hydrodynamique : échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +20 kV. Température : 25°C. Longueur d'onde de détection : 200 nm. Post-conditionnement : eau (2 min), HCl 1 mM (5 min), eau (2 min).

Même s'il ne résout pas entièrement le problème de l'adsorption irréversible du lysozyme, le post-conditionnement acide sera conservé de façon à garantir une meilleure stabilité du greffage HPC.

### 3.2.2.1.6. Effet de la force ionique sur l'adsorption du lysozyme

L'augmentation de la force ionique de l'électrolyte de séparation permet de minimiser les interactions entre les analytes et la paroi du capillaire, limitant ainsi les phénomènes d'adsorption. Une solution aqueuse de lysozyme à 0,25 mg/mL a donc été injectée dans des électrolytes phosphate de sodium (pH 7,0) de forces ioniques croissantes (30, 50, 75 et 100 mM). La tension appliquée lors de la migration est adaptée à la force ionique de l'électrolyte considéré, de façon à minimiser les phénomènes de diffusion causés par effet Joule (courant  $I < 50 \mu\text{A}$ ). Les profils électrophorétiques obtenus aux différentes forces ioniques sont similaires ; ils se composent d'un pic fin suivi d'un plateau d'adsorption traduisant une adsorption irréversible. La hauteur de ce plateau d'adsorption représente environ 10% de la hauteur du pic et augmente au cours des analyses successives. La Figure 72 présente les hauteurs de pic et de plateau correspondant aux différentes forces ioniques étudiées. L'augmentation de la force ionique s'accompagne d'une légère augmentation de la hauteur du pic (+22% entre 30 et 100 mM), peut-être liée à une diminution du phénomène d'adsorption. Le rapport des hauteurs plateau/pic le plus faible est obtenu pour une force ionique de 75 mM (8,5%) ; cependant, la limitation de l'adsorption reste très minime. L'augmentation de la force ionique ne semble donc pas avoir d'influence notable sur l'adsorption du lysozyme ; en outre, les inconvénients qu'elle engendre (diminution de la mobilité électrophorétique conduisant à un allongement des temps d'analyse, augmentation de l'effet Joule) limitent sa mise en place.



**Figure 72 : hauteur du pic (gris foncé) et du plateau d'adsorption (gris clair) du lysozyme en fonction de la force ionique de l'électrolyte de séparation (pH 7,0) dans un capillaire modifié HPC.** Capillaire modifié HPC n°12 (conditions optimisées) : 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30, 50, 75 ou 100 mM (pH 7,0). Echantillon : solution aqueuse

de lysozyme 0,25 mg/mL. Injection hydrodynamique : échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +20, +15, +10 ou +9 kV selon la force ionique (30, 50, 75 et 100 mM, respectivement). Température : 25°C. Longueur d'onde de détection : 200 nm. Post-conditionnement : eau (2 min), HCl 1 mM (5 min), eau (2 min).

### 3.2.2.1.7. Ajout de glycérol dans l'électrolyte de séparation

L'ajout d'une certaine proportion de glycérol dans l'électrolyte de séparation entraîne une augmentation de sa viscosité, ce qui a pour effet de réduire l'écoulement électroosmotique et pourrait réduire les interactions analyte-paroi, par stabilisation et solubilisation des protéines, limitant ainsi les phénomènes d'adsorption. Cette stratégie a donc été évaluée pour l'analyse du lysozyme dans un capillaire modifié HPC. Dans ce but, une solution aqueuse de lysozyme à 0,25 mg/mL a été injectée dans un tampon phosphate (respectivement formiate) de sodium 30 mM, pH 7,0 (respectivement 9,1) contenant de 0 à 30% (v/v) de glycérol. Avant chaque série d'injections, une mesure de flux a été effectuée par la méthode de Williams et Vigh [88], ce qui a également permis de déterminer la viscosité de l'électrolyte. En effet, le temps de sortie de la dernière zone de marqueur neutre injectée (appelé  $t_3$ ) donne directement accès à cette grandeur, connaissant les caractéristiques du capillaire, selon la loi de Hagen-Poiseuille (Equation 1).

$$\eta = \frac{d_c^2 P_0 t_3}{32 l L} \quad (1)$$

$\eta$  est la viscosité de l'électrolyte (Pa.s),  $d_c$  le diamètre interne du capillaire (m),  $P_0$  la pression de mobilisation appliquée (Pa),  $t_3$  le temps de sortie de la troisième zone de marqueur neutre (s),  $l$  la longueur effective du capillaire (m), et  $L$  sa longueur totale (m).

L'ajout de glycérol dans l'électrolyte de séparation entraîne une augmentation sensible de la viscosité de celui-ci ; cette dernière est ainsi quasiment doublée pour une teneur en glycérol de 30% (Figure 73).

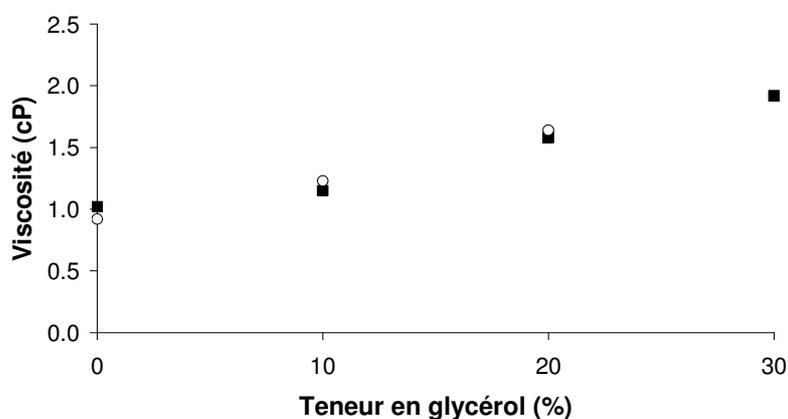
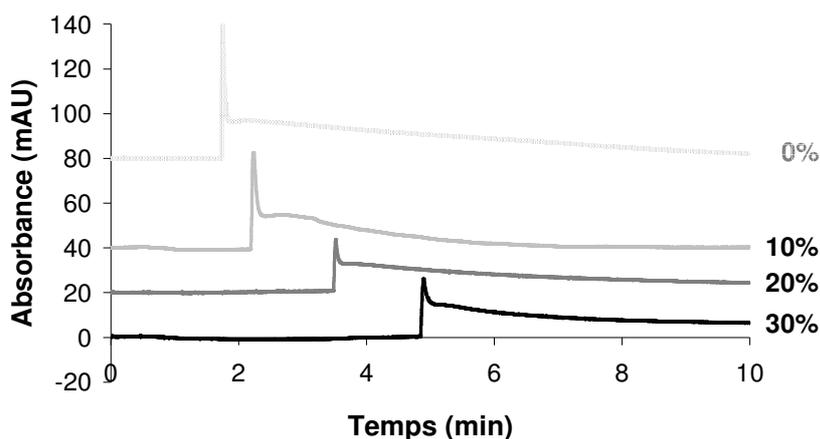


Figure 73 : viscosité des électrolytes phosphate de sodium 30 mM pH 7,0 (■) et formiate de sodium 30 mM pH 9,1 (○) en fonction de la teneur en glycérol. Capillaire modifié HPC (conditions optimisées) : 50  $\mu$ m de

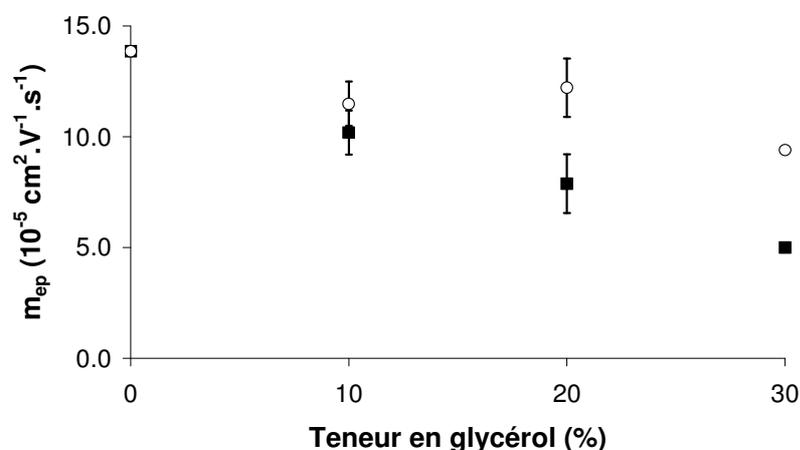
diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30 mM (pH 7,0) ou formiate de sodium 30 mM (pH 9,1), contenant 0-30% (v/v) de glycérol. Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 30 s), MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 30 s). Migration électrophorétique : +15 kV, 3 min. Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s). Percolation : 30 mbars. Température : 25°C.

Le flux électroosmotique reste stable et négligeable, avec des valeurs inférieures à  $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Dans le tampon phosphate (pH 7,0), le profil électrophorétique du lysozyme se compose d'un pic suivi d'une importante traînée d'adsorption (Figure 74).



**Figure 74 : profils électrophorétiques obtenus lors de l'injection d'une solution aqueuse de lysozyme dans un électrolyte contenant une proportion croissante de glycérol, en capillaire modifié HPC.** Capillaire modifié HPC (conditions optimisées) : 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30 mM (pH 7,0) contenant 0, 10, 20 ou 30% de glycérol. Echantillon : solution aqueuse de lysozyme 0,25 mg/mL. Injection hydrodynamique : échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +20 kV. Température : 25°C. Longueur d'onde de détection : 200 nm. Post-conditionnement : eau (1 min), HCl 1 mM (4 min), eau (5 min).

Lorsque la teneur en glycérol dans l'électrolyte augmente, la mobilité électrophorétique diminue du fait de l'accroissement de la viscosité (Figure 75), entraînant un allongement des temps de migration.



**Figure 75 : mobilité électrophorétique mesurée (■) et corrigée (○) du lysozyme en fonction de la teneur en glycérol dans un électrolyte phosphate de sodium 30 mM (pH 7,0).** Conditions : cf. Figure 74.

La mobilité électrophorétique peut être corrigée de l'effet de la viscosité selon l'expression suivante (Equation 2) :

$$m_{ep\ corr} = m_{ep} \times \frac{\eta}{\eta_0} \quad (2)$$

$m_{ep\ corr}$  et  $m_{ep}$  sont les mobilités électrophorétiques respectivement corrigée et mesurée,  $\eta$  la viscosité de l'électrolyte et  $\eta_0$  la viscosité de l'électrolyte en l'absence de glycérol. Il est intéressant de noter que la mobilité électrophorétique corrigée du lysozyme décroît légèrement quand la teneur en glycérol augmente, indépendamment de l'augmentation de la viscosité. Ce phénomène peut s'expliquer par la diminution de la permittivité relative du milieu lorsque la proportion de glycérol augmente : en effet, la permittivité relative du glycérol est inférieure à celle de l'eau ( $\epsilon_r = 47,0$  et  $80,1$  à  $20^\circ\text{C}$ , respectivement [89]). Cette diminution de la permittivité relative de l'électrolyte se traduit notamment par une nette diminution de la conductivité du milieu (le courant est divisé par deux lorsque l'on passe de 0 à 30% de glycérol), essentiellement due à l'augmentation de la viscosité. L'ajout de glycérol dans l'électrolyte favorise ainsi la formation de paires d'ions, ce qui conduit à une légère diminution de la charge nette du lysozyme et donc de sa mobilité électrophorétique.

Cette stratégie ne permettant cependant pas de réduire de façon suffisante l'adsorption du lysozyme, elle sera donc abandonnée.

### 3.2.2.2. Modification permanente par l'alcool polyvinylique

Afin de tenter de réduire les interactions de type hydrophobe entre le lysozyme et le revêtement de la surface, une modification par un polymère hydrophile neutre, l'alcool polyvinylique (PVA) (Figure 76) a également été testé.

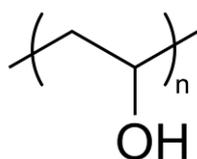


Figure 76 : structure de l'alcool polyvinylique (PVA)

La modification par le PVA peut s'effectuer selon deux approches distinctes : (i) un greffage direct, par simple physisorption puis cuisson du polymère [90] ; (ii) un greffage covalent par « cross-linking » avec un aldéhyde bifonctionnel, le glutaraldéhyde (GA) [86].

Le greffage direct est réalisé suivant la procédure développée par Peterson et al. [90], très similaire à celle employée pour le greffage HPC. Dans un premier temps, 12  $\mu\text{L}$  d'une solution aqueuse de PVA (5 g / 100 mL) sont percolés dans le capillaire à un débit de 0,5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , à l'aide d'un pousse-seringue. Le capillaire est ensuite séché sous flux d'azote (5 bars) pendant 1 h, chauffé dans un four de chromatographie phase gazeuse (GC) de 40 à 145°C (5°C/min) puis cuit pendant 3 h à 145°C, toujours sous flux d'azote. Après refroidissement (10°C/min puis à température ambiante), la fenêtre de détection est réalisée par combustion de la gaine de polyimide.

Le flux électroosmotique résiduel, mesuré par la méthode de William et Vigh [88] dans un tampon phosphate de sodium 30 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM (pH 6,7), est non négligeable ( $\sim 3.10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et plus élevé que dans un capillaire modifié HPC. De plus, celui-ci est instable et augmente sensiblement après stockage à l'eau. Ceci semble indiquer un mauvais recouvrement de la surface de silice par le polymère, sans doute du fait de son hydrophilicité élevée. L'injection d'une solution aqueuse de lysozyme à 0,25 mg/mL dans le tampon de séparation précédent ne donne lieu à aucun signal caractéristique d'une protéine. Des électrolytes de pH plus faibles (acétate de sodium 30 mM (pH 5,0) et formiate de sodium 30 mM (pH 3,3)) ont également été employés, sans résultat. Le greffage direct par le PVA n'a pas donné lieu à des résultats satisfaisants pour l'analyse du lysozyme.

Afin d'améliorer l'homogénéité et la stabilité du greffage, celui-ci peut être réalisé de façon covalente par « cross-linking » avec le glutaraldéhyde (GA) (Figure 77), en adaptant le protocole développé par Belder et al. [86]. Le capillaire, placé dans l'appareil de CE, est tout d'abord rempli par une solution aqueuse acidifiée de GA (HCl 5%, GA 20%) en appliquant une pression de 935 mbar pendant 5 min, puis par une solution aqueuse acidifiée de PVA (HCl 1,25%, PVA 4,5%) pendant 80 min. Après séchage sous flux d'azote pendant 10 min, le capillaire est chauffé dans le four GC de 40 à 160°C (6°C/min), cuit à 160°C pendant 30 min puis refroidi (10°C/min puis à température ambiante). La fenêtre de détection est ensuite réalisée par combustion de la gaine de polyimide.



Figure 77 : structure du glutaraldéhyde (GA)

Lors de l'étape de percolation de la solution de PVA, aucune goutte de polymère n'est observée en sortie de capillaire. Une tentative de percolation a donc été réalisée à l'aide du pousse-seringue (12  $\mu\text{L}$  à 0,5  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), sans résultat. Une étape d'activation a également été

introduite avant le remplissage par la solution de GA : rinçage par une solution de soude 1 M (15 min) puis 0,1 M (10 min), et lavage à l'eau ultrapure (10 min). Cette tentative s'est une fois de plus soldée par l'échec de la percolation de la solution de PVA. Ce problème est peut être dû à une réaction en masse du PVA avec le GA, conduisant à l'obstruction du capillaire. En effet, dans la méthode développée par Belder et al. [86], seule une courte zone de solution de PVA est introduite dans le capillaire, puis poussée à l'aide d'un gaz pressurisé ; la réaction entre le PVA et le GA a lieu à l'interface entre les zones, conduisant à la formation d'un film de polymère homogène sur la surface de silice. L'adaptation des conditions opératoires n'a pas permis de reproduire ce résultat et a abouti à l'échec de la modification.

### ***3. 3. Préconditionnement acide du capillaire (phénomène d'hystérèse de pH)***

Une autre approche permettant de limiter l'adsorption de composés basiques consiste à contrôler la charge de surface du capillaire grâce à un preconditionnement adapté. En effet, s'il est connu que le pH de l'électrolyte influence fortement l'ionisation des groupements silanol de surface, il a été observé que la mobilité électroosmotique dépendait également du prétraitement subi par le capillaire [85]. Ainsi, la mobilité électroosmotique obtenue dans un capillaire en silice vierge préalablement exposé à des conditions acides est sensiblement plus faible que celle observée après un preconditionnement basique, en particulier lorsque le pH de l'électrolyte de séparation se situe dans la zone pH 4 – 7 (correspondant à la zone d'inflexion de la sigmoïde  $m_{eo} = f(\text{pH})$ ). Ce phénomène d'hystérèse de pH est dû à la cinétique lente de l'équilibre de protonation/déprotonation des silanols. Un modèle de l'interface silice-solution a également été proposé afin d'expliquer plus finement ce phénomène d'hystérèse [91]. Lors d'un preconditionnement acide, une couche de gel poreux de silice se forme à l'interface silice-solution, conduisant à une diminution du potentiel  $\zeta$  et de la mobilité électroosmotique du fait de la pénétration des contre-ions de l'électrolyte dans le gel. En revanche, lors d'un preconditionnement basique, une couche fraîche de silice est créée par dissolution de la silice, et résulte en des valeurs de potentiel  $\zeta$  et de mobilité électroosmotique plus élevées. Le phénomène d'hystérèse de pH entraîné par le preconditionnement acide d'un capillaire en silice vierge a été employé afin de réduire le flux électroosmotique en vue de la préconcentration d'analytes basiques [92] ou pour diminuer les phénomènes d'adsorption rencontrés lors de l'analyse de protéines basiques telles que la  $\beta_2$ -

glycoprotéine I ( $\beta_2$ gpI, pI  $\sim$  8) [93] ou des protéines modèles (pI 8 – 11) dont le lysozyme [94].

Afin de minimiser l'adsorption du lysozyme sur la paroi interne du capillaire en silice vierge, un préconditionnement acide à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique est effectué avant chaque injection, de façon à engendrer un phénomène d'hystérèse de pH. De plus, en début de journée, le protocole d'activation suivant est appliqué : HCl 1 M (15 min) et HCl 0,1 M (10 min) (pression de 935 mbars). En fin de journée, le capillaire est nettoyé puis séché selon la procédure suivante : HCl 1 M (15 min), eau ultrapure (2 min), air (5 min) (pression de 935 mbars). Avant chaque analyse, le capillaire subi un préconditionnement acide inspiré par Bohlin et al. [93] : HCl 0,1 M (3 min) puis BGE (1 min) (pression de 935 mbars).

### 3.3.1. Influence du pH de l'électrolyte (gamme pH 3 – 7)

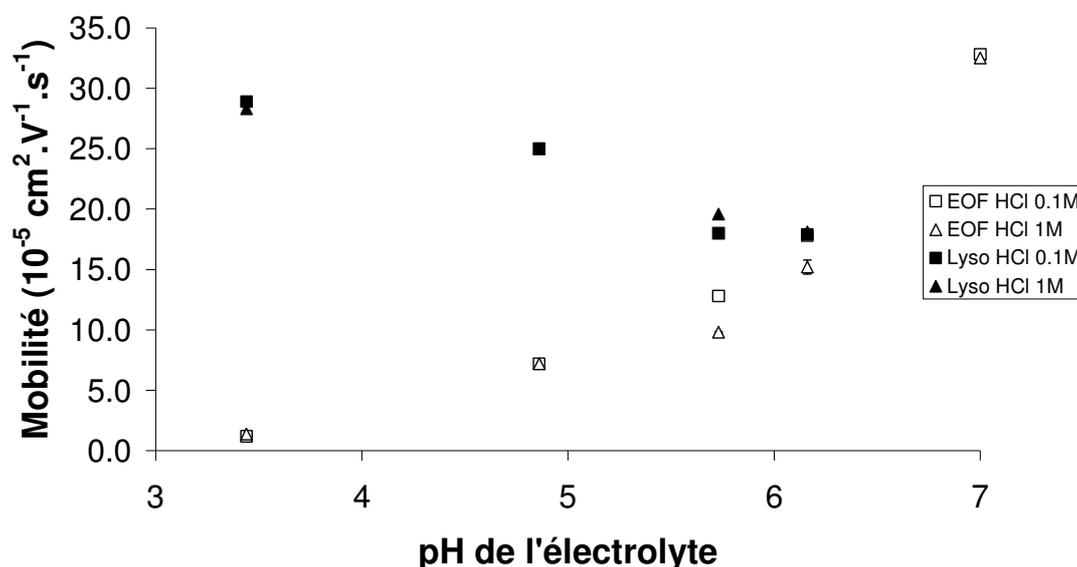
Dans un premier temps, l'influence du pH de l'électrolyte (gamme pH 3 – 7) et de la solution de préconditionnement acide (HCl 0,1 ou 1 M) sur le phénomène d'hystérèse ainsi que sur l'adsorption du lysozyme a été étudiée. Le lysozyme (solution aqueuse à 0,25 mg/mL) et le marqueur neutre sont injectés dans différents électrolytes de séparation (Tableau 6), après un préconditionnement acide à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 0,1 ou 1 M, afin de déterminer l'influence du pH sur les mobilités électroosmotique et électrophorétique (Figure 78). Les profils électrophorétiques obtenus pour le préconditionnement HCl 1M sont présentés sur la Figure 79.

**Tableau 6 : nature, force ionique, pH et absorbance UV (200 nm) des différents électrolytes de séparation utilisés.**

N°	Electrolyte	Force ionique	pH	Absorbance UV (200 nm)
<b>A</b>	Formiate de sodium	30 mM	3,4	22,9 mAU
<b>B</b>	Acétate de sodium	30 mM	4,9	33,4 mAU
<b>C</b>	Bis-Tris/HCl	30 mM	5,7	63,5 mAU
<b>D</b>	Bis-Tris/HCl	30 mM	6,2	193,6 mAU
<b>E</b>	Phosphate de sodium	30 mM	7,0	2,2 mAU

Lorsque le pH de l'électrolyte diminue, la mobilité électroosmotique diminue également du fait de la protonation plus importante des silanols (Figure 78). Pour l'électrolyte le plus acide (formiate de sodium pH 3,4), le flux est négligeable ( $\sim 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>.V

$^1.s^{-1}$ ) et doit donc être mesuré par la méthode de William et Vigh. En revanche, la concentration de la solution d'HCl utilisée lors du préconditionnement (0,1 ou 1 M) ne semble pas avoir d'influence notable sur l'intensité du phénomène d'hystérèse de pH, puisque les valeurs de flux obtenues sont quasi-identiques.



**Figure 78 :** évolution du flux électroosmotique (blanc) et de la mobilité électrophorétique du lysozyme (noir) en fonction du pH de l'électrolyte, avec préconditionnement HCl 0,1 M (carrés) ou HCl 1 M (triangles). Capillaire en silice vierge : 50  $\mu$ m de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Activation : HCl 1 M (15 min), HCl 0,1 M (10 min). Préconditionnement : HCl 0,1 M ou 1 M (3 min), BGE (1 min). Electrolyte de séparation : cf. Tableau 6. Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Echantillon : solution aqueuse de lysozyme à 0,25 mg/mL. Injection hydrodynamique : échantillon (30 mbars, 12 s), BGE (30 mbars, 2 s), MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +15 kV. Température : 25°C.

La mobilité électrophorétique du lysozyme augmente lorsque le pH diminue, du fait de l'augmentation de sa charge (Figure 78Figure 79). A pH neutre, le lysozyme est détecté après le passage du neutre, sous forme d'un massif très étalé (Figure 79E), sans doute du fait d'une adsorption trop importante sur la surface du capillaire. Là encore, l'utilisation d'une solution d'HCl 0,1 ou 1 M pour l'étape de préconditionnement acide n'a montré aucune différence significative. Il est intéressant de noter que la diminution de mobilité électrophorétique observée compense l'augmentation de flux, ce qui aboutit à une mobilité apparente quasi-constante, et donc à des temps de migrations comparables quel que soit le pH de l'électrolyte.

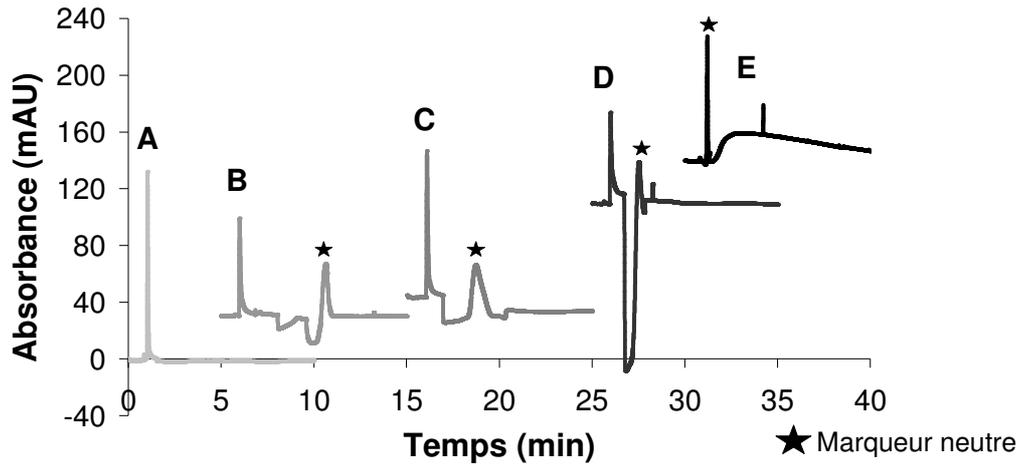


Figure 79 : profil électrophorétique du lysozyme en fonction du pH de l'électrolyte, avec préconditionnement acide HCl 1 M: pH 3,4 (A), pH 4,9 (B), pH 5,7 (C), pH 6,2 (D) et pH 7,0 (E). Décalage de 5 min sur l'échelle des abscisses successivement pour chaque électrophérogramme. Conditions : cf. Figure 78.

Les caractéristiques du pic du lysozyme (hauteur, largeur, aire corrigée et symétrie) ont également été étudiées en fonction du pH de l'électrolyte et du préconditionnement (Figure 80).

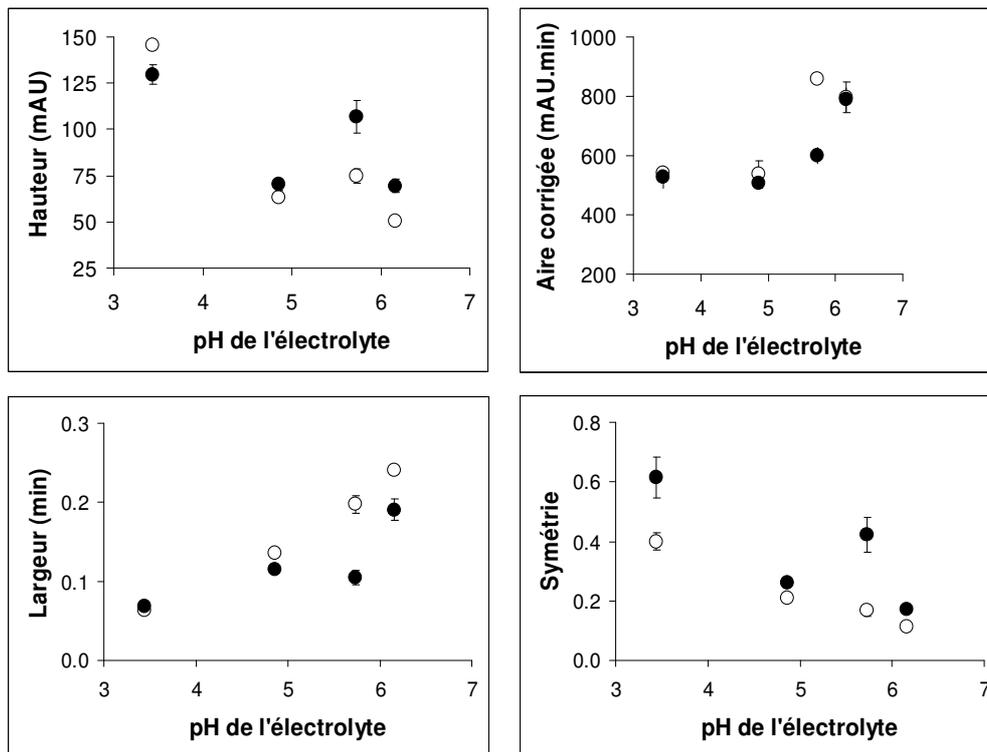


Figure 80 : caractéristiques (hauteur, aire corrigée, largeur et symétrie) du pic du lysozyme en fonction du pH de l'électrolyte de séparation, avec préconditionnement HCl 0,1 M (rond blanc) ou 1 M (rond noir). Conditions : cf. Figure 78.

Le temps de migration du lysozyme étant sensiblement le même quel que soit le pH de l'électrolyte, les différences observées sont nécessairement le fruit de la nature de

l'électrolyte ou de l'intensité des interactions protéine-paroi. Lorsque le pH de l'électrolyte augmente, le pic du lysozyme « s'étale » (Figure 79), ce qui se traduit par une diminution de la hauteur, une augmentation de la largeur et de l'aire corrigée, ainsi que par une dégradation de la symétrie du pic. Cette dernière peut être liée à l'augmentation de la différence de mobilité entre le lysozyme (dont la mobilité diminue quand le pH augmente) et le co-ion de l'électrolyte ( $\text{Na}^+$  :  $m^\circ = 51,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ou Tris :  $m^\circ = 29,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). L'étalement et la déformation du pic peuvent être aussi attribués à une augmentation de l'adsorption du lysozyme. Le préconditionnement HCl 1 M semble offrir une meilleure symétrie, ainsi qu'une légère réduction de la largeur et de l'aire corrigée par rapport au préconditionnement HCl 0,1 M ; l'adsorption de la protéine serait donc défavorisée, mais de façon assez peu significative cependant.

En raison de la forte absorption UV des tampons Bis-Tris, des tampons MES/NaOH de pH similaire (pH 6,1 ; pH 6,2 et pH 6,4) ont également été testés ; cependant, les profils électrophorétiques du lysozyme obtenus dans ces électrolytes présentent une ligne de base perturbée, ce qui rend leur utilisation peu favorable.

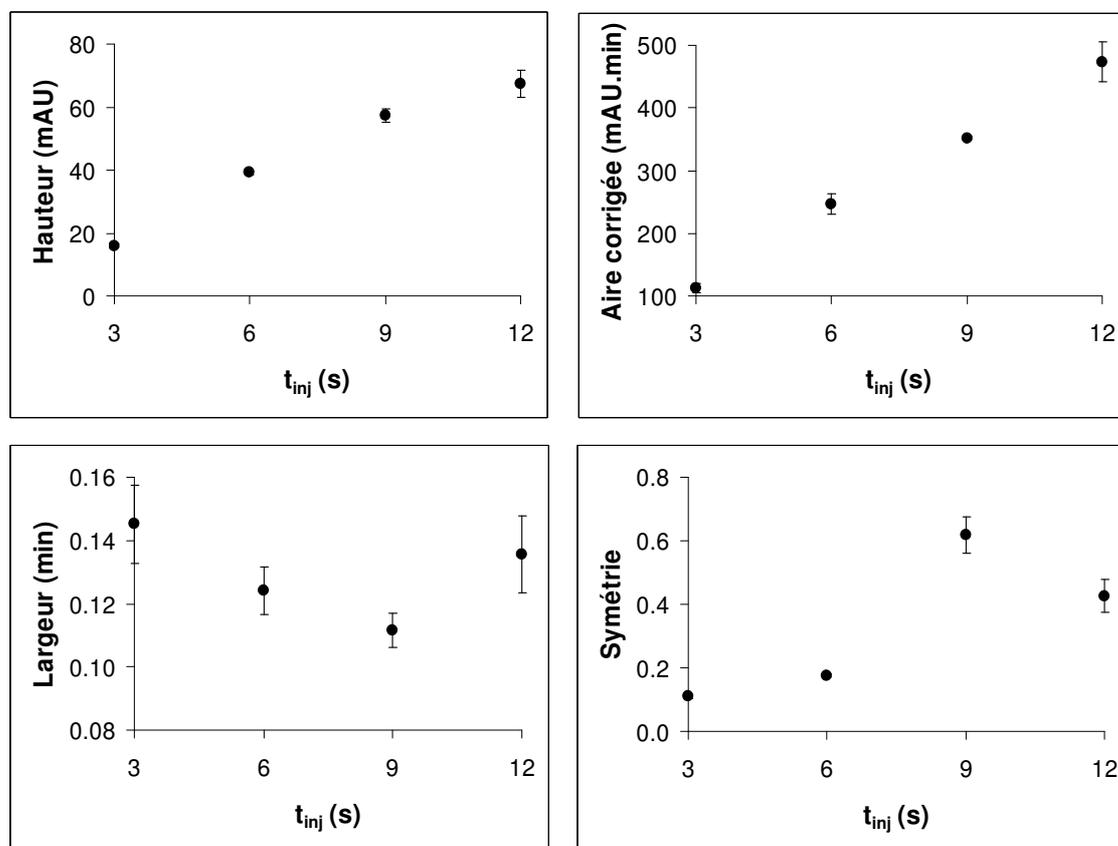
### 3.3.2. Optimisation de l'analyse du lysozyme à pH 5,7

L'analyse du lysozyme dans l'électrolyte C (Bis-Tris 30 mM pH 5,7) a ensuite été réalisée et optimisée. Avant chaque analyse, le capillaire subit le préconditionnement acide suivant : HCl 0,1 M ( $t_{\text{HCl}}$ ) puis BGE ( $t_{\text{BGE}}$ ). Le protocole d'injection séquentielle suivant est réalisé : solution aqueuse de lysozyme à 0,25 mg/mL (30 mbars,  $t_{\text{inj}}$ ), BGE (30 mbars, 2 s), solution aqueuse de formamide 0,05% (v/v) (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Sauf indication contraire, la migration des composés est effectuée en appliquant une tension positive de + 15 kV aux bornes du capillaire. La détection est réalisée par absorbance UV à 200 nm. L'influence des paramètres suivants sur le profil électrophorétique du lysozyme a été étudiée : volume d'injection du lysozyme et temps de préconditionnement du capillaire ( $t_{\text{HCl}}$  et  $t_{\text{BGE}}$ ).

#### 3.3.2.1. Influence du volume d'injection du lysozyme

L'injection du lysozyme a été réalisée dans les conditions décrites précédemment, en faisant varier son temps d'injection ( $t_{\text{inj}}$ ) de 3 à 12 s, ce qui revient à faire varier le volume

injecté de 4,5 à 18 nL. Les temps de préconditionnement  $t_{\text{HCl}}$  et  $t_{\text{BGE}}$  sont fixés à 3 min et 1 min, respectivement. L'évolution des caractéristiques du pic du lysozyme en fonction de  $t_{\text{inj}}$  est présentée Figure 81.



**Figure 81 : caractéristiques (hauteur, aire corrigée, largeur et symétrie) du pic du lysozyme en fonction du temps d'injection.** Capillaire en silice vierge : 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Activation : HCl 1 M (15 min), HCl 0,1 M (10 min). Préconditionnement : HCl 0,1 M (3 min), BGE (1 min). Electrolyte de séparation : Bis-Tris/HCl 30 mM (pH 5,7). Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Echantillon : solution de lysozyme à 0,25 mg/mL dans le BGE. Injection hydrodynamique : échantillon (30 mbars,  $t_{\text{inj}} = 3, 6, 9$  et 12 s), BGE (30 mbars, 2 s), MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +15 kV. Température : 25°C.

Lorsque le temps d'injection du lysozyme augmente, le volume injecté augmente proportionnellement, ce qui conduit à une augmentation de la hauteur et de l'aire corrigée du pic. La largeur de pic la plus faible et la symétrie la meilleure sont obtenues pour un temps d'injection de 9 s (volume injecté de 12 nL). Le temps d'injection ne semble en revanche avoir qu'une faible influence sur les mobilités électroosmotique et électrophorétique (Figure 82) ce qui semble indiquer une faible adsorption à ce pH.

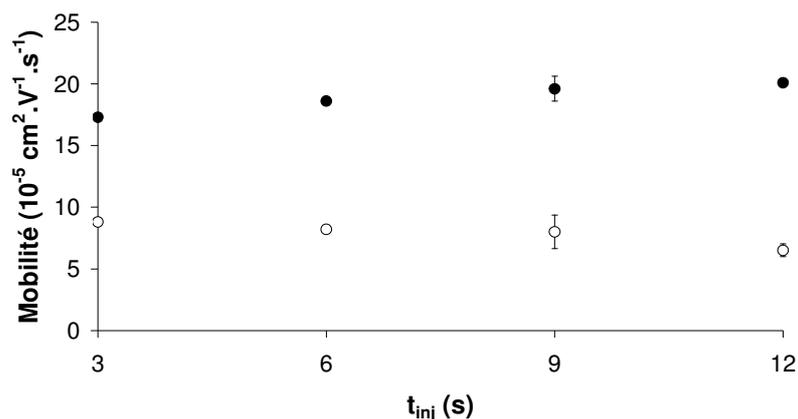


Figure 82 : évolution du flux électroosmotique (cercles blancs) et de la mobilité électrophorétique (cercles noirs) en fonction du temps d'injection du lysozyme. Conditions : cf. Figure 81.

### 3.3.2.2. Influence du temps de préconditionnement acide

L'influence du temps de préconditionnement ( $t_{HCl}$  et  $t_{BGE}$ ) a ensuite été étudiée. Dans un premier temps, l'effet de la variation de  $t_{HCl}$  a été étudié en fixant  $t_{BGE}$  à 1 min. L'augmentation de  $t_{HCl}$  entraîne une faible diminution du flux électroosmotique (Figure 83) qui traduit une légère diminution de la charge de surface du capillaire.

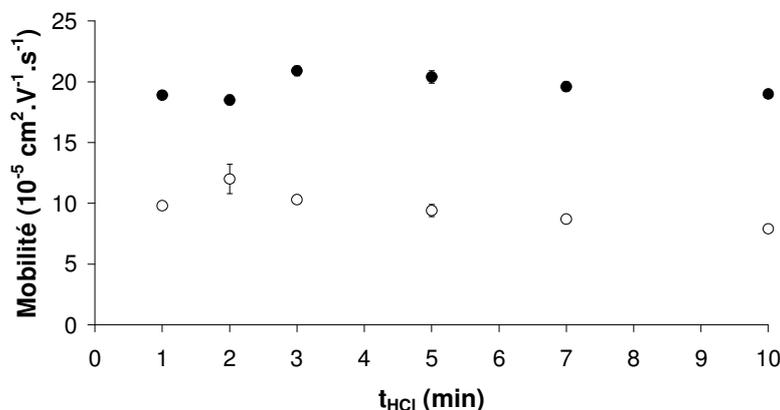


Figure 83 : évolution du flux électroosmotique (cercles blancs) et de la mobilité électrophorétique (cercles noirs) du lysozyme en fonction du temps de préconditionnement HCl 0,1 M. Capillaire en silice vierge : 50  $\mu$ m de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Activation : HCl 1 M (15 min), HCl 0,1 M (10 min). Préconditionnement : HCl 0,1 M ( $t_{HCl}$  = 1, 2, 3, 5, 7 et 10 min), BGE (1 min). Electrolyte de séparation : Bis-Tris/HCl 30 mM (pH 5,7). Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Echantillon : solution de lysozyme à 0,25 mg/mL dans le BGE. Injection hydrodynamique : échantillon (30 mbars, 12 s), BGE (30 mbars, 2 s), MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +15 kV. Température : 25°C.

Les caractéristiques du pic sont optimales (hauteur et aire corrigée la plus importante, largeur la plus faible et meilleure symétrie) pour un temps de préconditionnement acide de 3 min (Figure 84).

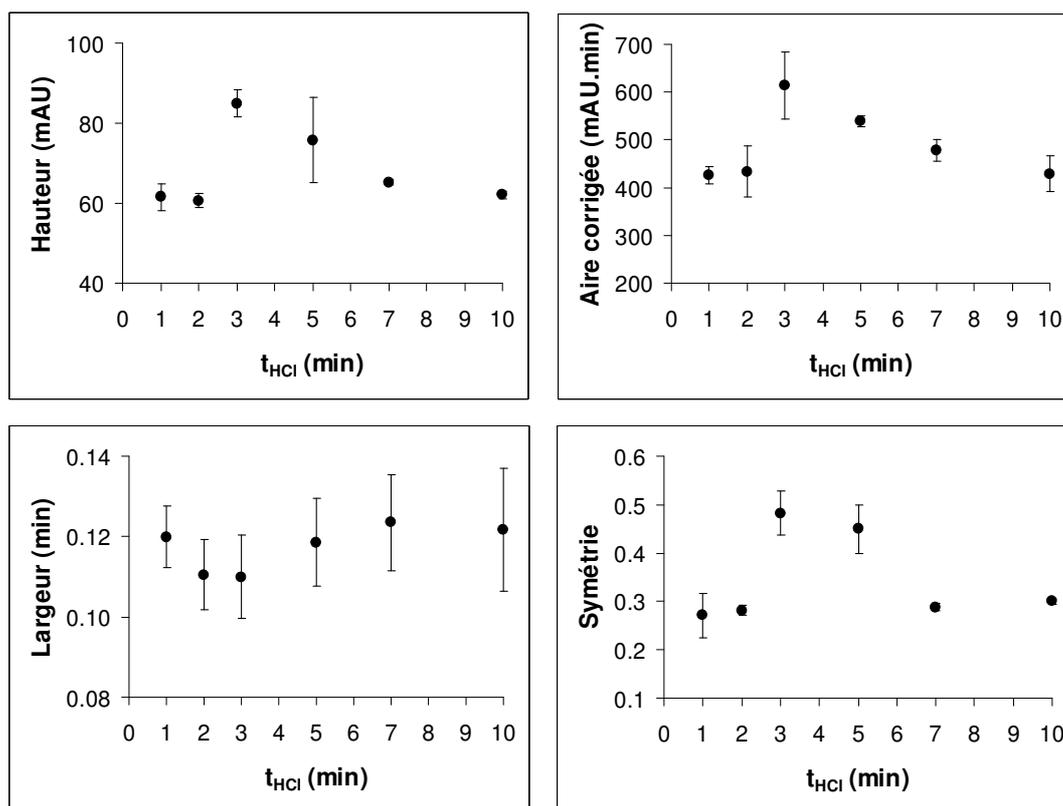


Figure 84 : caractéristiques (hauteur, aire corrigée, largeur et symétrie) du pic du lysozyme en fonction du temps de préconditionnement HCl 0,1 M. Conditions : cf. Figure 83.

### 3.3.2.3. Influence du temps de préconditionnement de l'électrolyte

$t_{\text{HCl}}$  étant fixé à 3 min, l'influence de  $t_{\text{BGE}}$  est ensuite étudiée. L'augmentation du temps de préconditionnement avec l'électrolyte entraîne une légère diminution de la mobilité électroosmotique (Figure 85), ce qui va à l'encontre du phénomène attendu ; en effet, les silanols de surface se déprotonant lentement lors du rinçage par l'électrolyte (pH neutre), une augmentation de la mobilité électroosmotique devrait être observée du fait de l'atténuation du phénomène d'hystérèse.

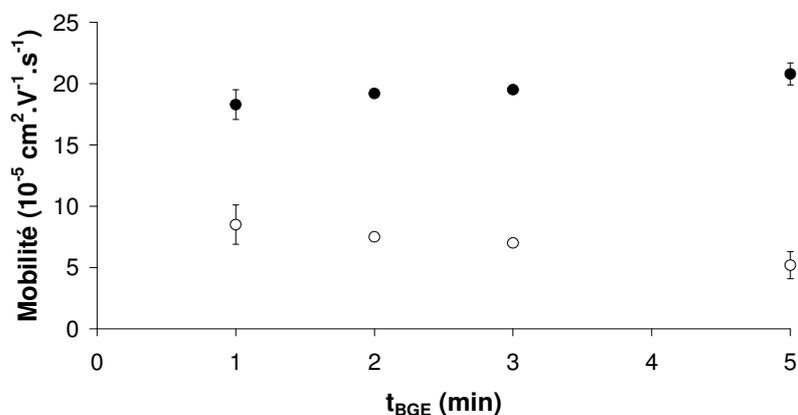


Figure 85 : évolution du flux électroosmotique (cercles blancs) et de la mobilité électrophorétique (cercles noirs) du lysozyme en fonction du temps de préconditionnement BGE. Capillaire en silice vierge : 50  $\mu\text{m}$  de

diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Activation : HCl 1 M (15 min), HCl 0,1 M (10 min). Préconditionnement : HCl 0,1 M (3 min), BGE ( $t_{\text{BGE}} = 1, 2, 3, 5, 7$  et 10 min). Electrolyte de séparation : Bis-Tris/HCl 30 mM, pH 5,7. Marqueur neutre : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Echantillon : solution de lysozyme à 0,25 mg/mL dans le BGE. Injection hydrodynamique : échantillon (30 mbars, 12 s), BGE (30 mbars, 2 s), marqueur neutre (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +15 kV. Température : 25°C.

Les caractéristiques du pic du lysozyme (Figure 86), variant de façon non significative, ne permettent pas de déterminer de valeur de  $t_{\text{BGE}}$  optimale.

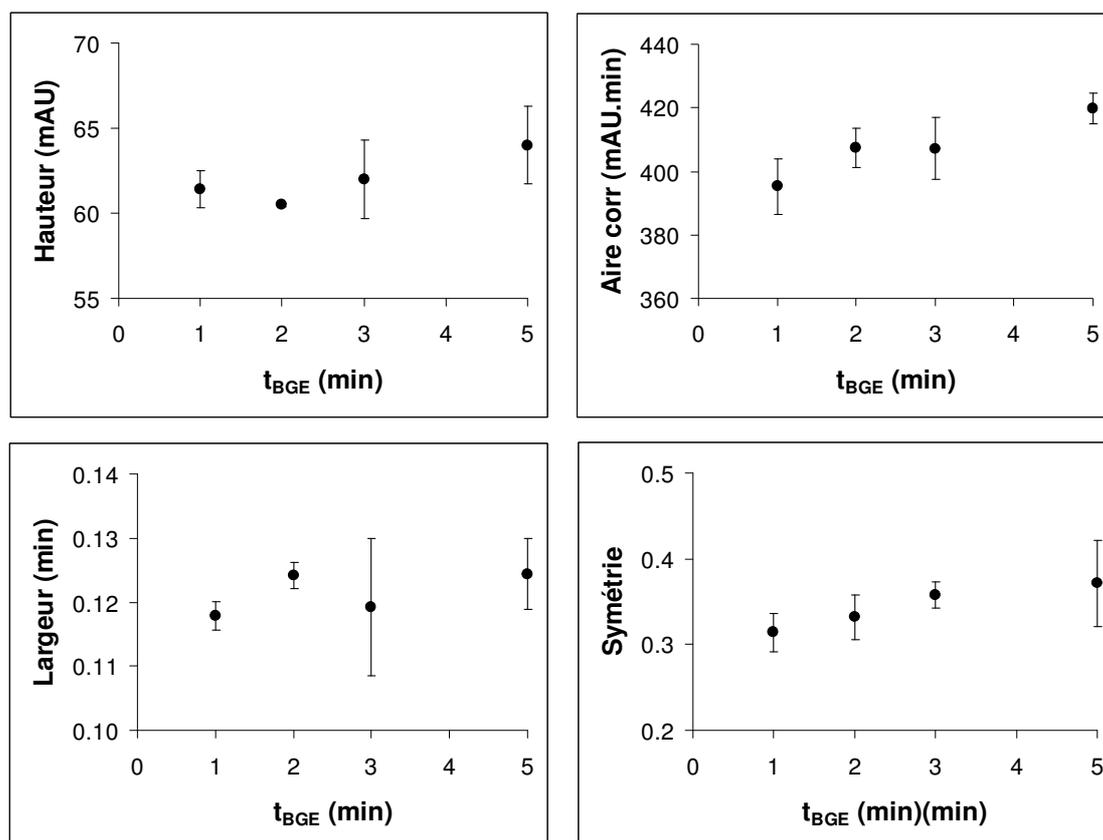


Figure 86 : caractéristiques (hauteur, aire corrigée, largeur et symétrie) du pic du lysozyme en fonction du temps de preconditionnement BGE. Conditions : cf. Figure 85.

## Conclusion

L'emploi de pH extrêmes n'ayant pas permis d'observer le lysozyme dans un capillaire en silice vierge, du fait de sa forte adsorption sur la paroi de silice, différents traitements de la paroi du capillaire ont donc été évalués.

La modification dynamique de la surface du capillaire par un polymère cationique, le polybrène, a permis une analyse satisfaisante du lysozyme, mais est incompatible avec l'analyse de l'aptamère, chargé négativement à pH neutre. La modification dynamique par le PEO, un polymère neutre, présente un certain nombre d'inconvénients (écoulement électroosmotique résiduel non négligeable, formation de multicouches, mobilité très faible des protéines due à une possible interaction avec le PEO) qui ne permettent pas d'envisager son utilisation pour l'analyse du lysozyme. La modification permanente par le PVA n'a pas permis d'obtenir de résultats satisfaisants : le greffage en mode direct conduit à un flux résiduel non négligeable et à l'adsorption totale du lysozyme, et le greffage covalent n'a pas pu être effectué du fait de l'échec de l'étape de percolation de la solution de PVA.

La modification permanente par physisorption de l'HPC semble offrir le meilleur compromis entre la limitation de l'adsorption du lysozyme et la compatibilité avec l'analyse de l'aptamère. L'optimisation du procédé de greffage (débit de percolation, temps d'incubation, mode de réalisation de la fenêtre de détection) et des conditions opératoires (post-conditionnement, force ionique de l'électrolyte, ajout de glycérol) ont permis de limiter l'adsorption résiduelle du lysozyme. C'est donc ce type de modification qui sera employée ultérieurement pour l'étude de l'interaction aptamère – lysozyme.

L'introduction d'une étape de préconditionnement acide a également rendu possible l'analyse du lysozyme en silice vierge, grâce au phénomène d'hystérèse de pH. L'optimisation du volume d'injection et des temps de préconditionnements a permis d'améliorer le profil électrophorétique du lysozyme à pH légèrement acide (5,7).

## Références bibliographiques

- [1] Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O., Yarus, M., *Annu. Rev. Biochem.* 1995, 64, 763-797.
- [2] German, I., Buchanan, D. D., Kennedy, R. T., *Anal. Chem.* 1998, 70, 4540-4545.
- [3] Haes, A. J., Giordano, B. C., Collins, G. E., *Anal. Chem.* 2006, 78, 3758-3764.
- [4] Pavski, V., Le, X. C., *Anal. Chem.* 2001, 73, 6070-6076.
- [5] Buchanan, D. D., Jameson, E. E., Perlette, J., Malik, A., Kennedy, R. T., *Electrophoresis* 2003, 24, 1375-1382.
- [6] Huang, C.-C., Chang, H.-T., Cao, Z., Tan, W., *Anal. Chem.* 2004, 76, 6973-6981.
- [7] Li, Y., Guo, L., Zhang, F., Zhang, Z., *et al.*, *Electrophoresis* 2008, 29, 2570-2577.
- [8] Berezovski, M., Nutiu, R., Li, Y., Krylov, S. N., *Anal. Chem.* 2003, 75, 1382-1386.
- [9] Cox, J. C., Ellington, A. D., *Bioorg. Med. Chem.* 2001, 9, 2525-2531.
- [10] Canfield, R. E., *J. Biol. Chem.* 1963, 238, 2698-2707.
- [11] Jollès, P., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1969, 8, 227-239.
- [12] *Encyclopaedia Britannica*, 1997.
- [13] <http://www.sigmaaldrich.com>.
- [14] Wetter, R., Deutsch, H. F., *J. Biol. Chem.* 1951, 192, 237-242.
- [15] <http://www.vulgaris-medical.com>.
- [16] Proctor, V. A., Cunningham, F. E., *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1988, 26, 359-395.
- [17] Wasserfall, F., Teuber, M., *Appl. Environ. Microbiol.* 1979, 38, 197-199.
- [18] Marchal, R., Chaboche, D., Marchal-Delahaut, L., Gerland, C., *et al.*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2000, 48.
- [19] Simó, C., Elvira, C., González, N., Román, J. S., *et al.*, *Electrophoresis* 2004, 25, 2056-2064.
- [20] Frémont, S., Kanny, G., Nicolas, J. P., Moneret-Vautrin, D. A., *Allergy* 1997, 52, 224 - 228.
- [21] Tran, D. T., Janssen, K. P. F., Pollet, J., Lammertyn, E., *et al.*, *Molecules* 2010, 15, 1127-1140.
- [22] Lauer, H. H., McManigill, D., *Anal. Chem.* 1986, 58, 166-170.
- [23] McCormick, R. M., *Anal. Chem.* 1988, 60, 2322-2328.
- [24] Greena, J. S., Jorgenson, J. W., *J. Chromatogr.* 1989, 478, 63-70.
- [25] Doherty, E. A. S., Meagher, R. J., Albarghouthi, M. N., Barron, A. E., *Electrophoresis* 2003, 24, 34-54.
- [26] Verzola, B., Gelfi, C., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* 2000, 868, 85-99.
- [27] Malmsten, M., *J. Colloid Interface Sci.* 1998, 207, 186-199.
- [28] Lin, F.-Y., Chen, W.-Y., Hearn, M. T. W., *Anal. Chem.* 2001, 73, 3875-3883.
- [29] Soderquist, M. E., Walton, A. G., *J. Colloid Interface Sci.* 1980, 75, 386-397.
- [30] Graf, M., García, R. G., Wätzig, H., *Electrophoresis* 2005, 26, 2409-2417.
- [31] Norde, W., in: Baskin, A., Norde, W. (Eds.), *Physical Chemistry of Biological Interfaces*, Marcel Dekker, New-York 2000, p. 115.

- [32] Nakanishi, K., Sakiyama, T., Imamura, K., *J. Biosci. Bioeng.* 2001, 91, 233-244.
- [33] Towns, J. K., Regnier, F. E., *Anal. Chem.* 1992, 64, 2473-2478.
- [34] Yao, Y., Lenhoff, A. M., *Anal. Chem.* 2004, 76, 6743-6752.
- [35] Duc, P. L., Wang, Y., in: Guelcher, S. A., Hollinger, J. O. (Eds.), *Introduction to Biomaterials*, CRC Press, Boca Raton, FL 2006, p. 47.
- [36] Lucy, C. A., MacDonald, A. M., Gulcev, M. D., *Journal of Chromatography A* 2007, in press.
- [37] Lucy, C. A., MacDonald, A. M., Gulcev, M. D., *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 81-105.
- [38] Govindaraju, K., Ahmed, A., Lloyd, D. K., *J. Chromatogr. A* 1997, 768, 3-8.
- [39] Oda, R. P., Madden, B. J., Spelsberg, T. C., Landers, J. P., *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 85-92.
- [40] Righetti, P. G., Gelfi, C., Sebastiano, R., Citterio, A., *J. Chromatogr. A* 2004, 1053, 15-26.
- [41] Sebastiano, R., Gelfi, C., Righetti, P. G., Citterio, A., *J. Chromatogr. A* 2000, 894, 53-61.
- [42] Gelfi, C., Viganò, A., Ripamonti, M., Righetti, P. G., *et al.*, *Anal. Chem.* 2001, 73, 3862-3868.
- [43] Melanson, J. E., Baryla, N. E., Lucy, C. A., *Anal. Chem.* 2000, 72, 4110-4114.
- [44] Zhang, R., Somasundaran, P., *Adv. Colloid Interf. Sci.* 2006, 123, 213-229.
- [45] Manne, S., Cleveland, J. P., Gaub, H. E., Stucky, G. D., Hansma, P. K., *Langmuir* 1994, 10, 4409-4413.
- [46] Manne, S., Gaub, H. E., *Science* 1995, 270, 1480-1482.
- [47] Baryla, N. E., Melanson, J. E., McDermott, M. T., Lucy, C. A., *Anal. Chem.* 2001, 73, 4558-4565.
- [48] Castelletti, L., Verzola, B., Gelfi, C., Stoyanov, A., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* 200, 894, 281-289.
- [49] Dolník, V., *Electrophoresis* 2006, 27, 126-141.
- [50] Horvath, J., Dolnik, V., *Electrophoresis* 2001, 22, 644-655.
- [51] Cifuentes, A., de Frutos, M., Diez-Masa, J. C., *J. Dairy Sci.* 1993, 76, 1870-1875.
- [52] Tseng, W.-L., Lin, Y.-W., Chang, H.-T., *Anal. Chem.* 2002, 74, 4828-4834.
- [53] Yeung, E. S., Preisler, J., *Anal. Chem.* 1996, 68, 2885-2889.
- [54] Fermas, S., Gonnet, F., Daniel, R., *Analytical Biochemistry* 2008, 372, 258-260.
- [55] Gilges, M., Kleemlss, M. H., Schomburg, G., *Anal. Chem.* 1994, 66, 2038-2046.
- [56] Cifuentes, A., Rodriguez, M. A., Garcia-Montelongo, F. J., *J. Chromatogr. A* 1996, 742, 257-266.
- [57] Erim, F. B., Cifuentes, A., Poppe, H., Kraak, J. C., *J. Chromatogr. A* 1995, 708, 356-361.
- [58] Cifuentes, A., Poppe, H., Kraak, J. C., Erim, F. B., *J. Chromatogr. B* 1996, 681, 21-27.
- [59] Lubman, D. M., Li, M. X., Liu, L., Wu, J.-T., *Anal. Chem.* 1997, 69, 2451-2456.
- [60] Katayama, H., Ishihama, Y., Asakawa, N., *Anal. Chem.* 1998, 70, 5272-5277.
- [61] Somsen, G. W., Catai, J. R., Toraño, J. S., Jong, G. J. d., *Electrophoresis* 2006, 27, 2091-2099.
- [62] Dolník, V., Hutterer, K., *Electrophoresis* 2003, 24, 3998-4012.
- [63] Hjerten, S., *Chromatogr. Rev.* 1967, 9, 122-219.

- [64] Shen, Y., Smith, R. D., *J. Microcol. Sep.* 2000, 12, 135-141.
- [65] Gilges, M., Kleemiss, M. H., Schomburg, G., *Anal. Chem.* 1994, 66, 2038-2046.
- [66] Van Tassel, P. R., Miras, D., Hagege, A., Leroy, M., *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.* 1996, 183, 269-273.
- [67] Millot, M.-C., Xu, R. J., Sébille, B., Vidal-Madjar, C., *Analisis* 1999, 27, 125-131.
- [68] Towns, J. K., Regnier, F. E., *Anal. Chem.* 1991, 63, 1126-1132.
- [69] Huang, M., Mitchell, D., Bigelow, M., *J. Chromatogr. B* 1996, 677, 77-84.
- [70] Engelhardt, H., Cuñat-Walter, M. A., *J. Chromatogr. A* 1995, 716, 27-33.
- [71] Bruin, G. J. M., Huisden, R., Kraak, J. C., Poppe, H., *J. Chromatogr.* 1989, 480, 339-349.
- [72] Bruin, G. J. M., Chang, J. P., Kuhlman, R. H., Zegers, K., *et al.*, *J. Chromatogr.* 1989, 471, 429-436.
- [73] Wassim Nashabeh, Rassi, Z. E., *J. Chromatogr.* 1991, 559, 367-383.
- [74] Smith, J. T., Rassi, Z. E., *J. High Resol. Chromatogr.* 1992, 15, 573-578.
- [75] Towns, J. K., Bao, J., Regnier, F. E., *J. Chromatogr.* 1992, 599, 227-237.
- [76] Malik, A., Zhao, Z., Lee, M. L., *J. Microcol. Sep.* 1993, 5, 119-125.
- [77] Zhao, Z., Malik, A., Lee, M. L., *J. Microcol. Sep.* 1992, 4, 411-417.
- [78] Hjertén, S., *J. Chromatogr. A* 1985, 347, 191-198.
- [79] Xu, R. J., Vidal-Madjar, C., Sébille, B., Diez-Masa, J. C., *J. Chromatogr. A* 1996, 730, 289-295.
- [80] Huang, M., Dubrovckova-Schneiderman, E., Novotny, M. V., Fatunmbi, H. O., Wirth, M. J., *J. Microcol. Sep.* 1994, 6, 571-576.
- [81] Huang, M., Plocek, J., Novotny, M. V., *Electrophoresis* 1995, 16, 396-401.
- [82] Cobb, K. A., Dolnik, V., Novotny, M., *Anal. Chem.* 1990, 62, 2478-2483.
- [83] Chiari, M., Nesi, M., Sandoval, J. E., Pesek, J. J., *J. Chromatogr. A* 1995, 717, 1-13.
- [84] Chiari, M., Dell'Orto, N., Gelain, A., *Anal. Chem.* 1996, 68, 2731-2736.
- [85] Lambert, W. J., Middleton, D. L., *Anal. Chem.* 1990, 62, 1585-1587.
- [86] Belder, D., Deege, A., Husmann, H., Kohler, F., Ludwig, M., *Electrophoresis* 2001, 22, 3813-3818.
- [87] Tran, N. T., Taverna, M., Miccoli, L., Angulo, J. F., *Electrophoresis* 2005, 26, 3105-3112.
- [88] Williams, B. A., Vigh, G., *Anal. Chem.* 1996, 68, 1174-1180.
- [89] in: Lide, D. R. (Ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton, FL 2004.
- [90] Peterson, Z. D., Collins, D. C., Bowerbank, C. R., Lee, M. L., Graves, S. W., *J. Chromatogr. B* 2002, 776, 221-229.
- [91] Huang, T. L., *Chromatographia* 1993, 35, 395-398.
- [92] Han, J. H., Chun, M.-S., Riaz, A., Chung, D. S., *Electrophoresis* 2005, 26, 480-486.
- [93] Bohlin, M. E., Kogutowska, E., Blomberg, L. G., Heegaard, N. H. H., *J. Chromatogr. A* 2004, 1059, 215-222.
- [94] Bohlin, M. E., Blomberg, L. G., Heegaard, N. H. H., *Electrophoresis* 2005, 26, 4043-4049.

# **Chapitre III**

**Etude de l'interaction entre l'aptamère anti-lysozyme et des cations mono- et divalents par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE)**

# 1. Introduction

Les aptamères sont de courtes séquences oligonucléotidiques (ADN simple brin ou ARN) qui présentent une affinité spécifique pour des cibles variées, allant des petites molécules aux protéines, voire aux cellules entières [1-3]. Ces molécules synthétiques sont isolées à partir de banques aléatoires via une technique de sélection *in vitro* baptisée SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) [4-6]. Tout comme les anticorps, les aptamères permettent la reconnaissance moléculaire d'une cible donnée, et offrent en outre un certain nombre d'avantages : affinité élevée et stabilité thermique accrue, tolérance à de larges gammes de pH et de concentration saline, faible coût, simplicité de la synthèse et du marquage. Du fait de ces propriétés remarquables, les aptamères peuvent être employés dans de nombreux domaines, notamment comme agents thérapeutiques ou de diagnostic, ou comme outils pour la recherche biomédicale [7-10].

Depuis plusieurs années, une attention particulière s'est portée sur l'étude de l'interaction de cations métalliques divalents avec l'ADN, ou plus généralement, avec des oligonucléotides, en présence ou absence de contre-ions monovalents, du fait de l'importance de ce phénomène du point de vue biologique et théorique [11]. Plusieurs sites de liaison potentiels peuvent être envisagés pour l'interaction ions métalliques – ADN, les plus probables étant le groupement phosphate et l'azote N7 des bases purines (adénine et guanine) [12]. Il est généralement admis que les cations « durs », tels que les cations alcalins et alcalino-terreux, se lient préférentiellement aux groupements phosphate, phénomène modélisé par la théorie de Manning pour la condensation des contre-ions [11, 13]. Les ions alcalins interagissent uniquement avec les groupements phosphate, chargés négativement, tandis que les ions alcalino-terreux peuvent également se lier aux bases aromatiques, bien qu'ils présentent une affinité supérieure pour le groupement phosphate. Les cations « mous », tels que les ions des métaux de transition, montrent une affinité pour les deux types de sites [14]. L'étude de l'interaction cation – ARN a montré que ce dernier pouvait se replier pour former des poches d'interaction spécifique avec les cations divalents. Ainsi, l'interaction entre un aptamère et sa cible, hautement liée à la conformation de l'aptamère, peut être influencée par de nombreux cations [15-20]. Jusqu'à maintenant, peu d'études ont été menées concernant l'interaction entre des cations monovalents ou divalents et des aptamères. Des études en RMN haute résolution ont révélé que le magnésium avait une influence significative sur la conformation libre de l'aptamère riboswitch dirigé contre l'adénine [20]. Grâce à l'utilisation

de méthodes de détection électrochimiques et de la microbalance à cristal de quartz (QCM), des auteurs ont montré que l'accroissement de la concentration en NaCl conduisait à une diminution de l'affinité thrombine – aptamère, probablement due à l'écrantage des charges négatives ou à un changement de conformation des sites d'interaction de l'aptamère [21]. Une autre étude basée sur les biocapteurs a avancé l'hypothèse d'une augmentation du nombre d'aptamères actifs (dans ce cas un aptamère ARN dirigé contre la S-adénosylhomocystéine) en présence de  $Mg^{2+}$  et  $Mn^{2+}$ , via la stabilisation d'une ou plusieurs conformations alternatives. Les oligonucléotides présentant une séquence riche en guanine (G), tels que l'aptamère anti-thrombine, peuvent former une structure d'ordre supérieur constituée d'au moins deux tétrades de G (G-quartet), appelée G-quadruplexe [22], pouvant être stabilisée par intercalation de cations monovalents ou divalents divers, tels que  $K^+$  [15, 16, 23],  $Ba^{2+}$  [15] ou  $Sr^{2+}$  [23] et favorisant ainsi la liaison entre l'aptamère et sa cible. La formation de G-quadruplexe a été mise en évidence à l'aide de différentes techniques, parmi lesquelles la spectrométrie de masse [24, 25], la spectroscopie de RMN [26], le dichroïsme circulaire [23, 27, 28] et l'électrophorèse capillaire [15, 16]. Des études en milieu libre menées en électrophorèse capillaire [15] et en électrophorèse capillaire sur gel (CGE) [16] ont montré qu'il était possible de séparer la forme linéaire et la structure G-quartet d'un aptamère de 15 bases dirigé contre la thrombine en présence de  $K^+$  dans l'électrolyte de séparation, la forme G-quartet étant la seule capable de se lier à la thrombine pour former un complexe. Une étude de l'interaction aptamère – oligonucléotide par électrophorèse capillaire a également mis en évidence l'impact des cations monovalents et divalents sur la formation du complexe [17]. Cependant, aucune étude systématique n'a été menée pour comprendre l'influence des cations monovalents et divalents sur la structure de l'aptamère.

Les méthodes disponibles pour la caractérisation quantitative des interactions nucléotides – ions métalliques peuvent être classées en deux groupes : les méthodes basées sur le mélange des partenaires (spectroscopie, densimétrie, potentiométrie et calorimétrie [29-31]) et celles basées sur la séparation des différentes formes (ultrafiltration, centrifugation, chromatographie et électrophorèse). Parmi celles-ci, l'électrophorèse capillaire offre de puissants avantages qui en font une technique de choix pour l'étude des interactions non-covalentes. La méthode la plus couramment employée en électrophorèse capillaire pour l'estimation des constantes d'interaction, appelée électrophorèse capillaire d'affinité (ACE), consiste à mesurer la variation de mobilité électrophorétique du substrat dans des électrolytes de séparation contenant une concentration croissante de ligand [32-34]. Cette méthode s'est notamment montrée être un outil efficace pour l'étude des interactions ADN – ion métallique

menée par Tajmir-Riahi et al. [35-37]. Des interactions entre de courts oligonucléotides (4 – 24 bases) et des cations métalliques divalents ont également été étudiées par ACE par Schwarz et al. [38, 39]. Ces travaux ont mis en évidence le caractère crucial du choix de l'électrolyte support, ses constituants pouvant former des complexes binaires ou ternaires avec l'ADN et/ou les ions métalliques présents. Les constantes d'interaction ont également été calculées, et les résultats rationalisés suivant un modèle à deux sites impliquant des donneurs phosphate et azote. Cependant, les auteurs n'ont pas proposé de correction des données relative aux effets de force ionique, et n'ont pas confronté les résultats obtenus avec les prédictions de la théorie de Manning.

Dans cette partie, nous présentons l'utilisation de l'électrophorèse capillaire d'affinité pour l'étude des interactions entre un aptamère anti-lysozyme et des cations mono et divalents. Cet aptamère, sélectionné par SELEX automatisé [40], a été employé pour l'élaboration d'un aptasenseur pour la détection voltamétrique du lysozyme [41]. Cependant, aucune étude n'a reporté sa caractérisation ainsi que l'étude de son interaction avec des cations ou le lysozyme.

Les effets de l'ajout d'une concentration croissante de cation monovalent ou divalent dans le BGE sur la mobilité électrophorétique de l'aptamère ont été étudiés. Afin d'interpréter les résultats obtenus, la charge effective de l'aptamère a été évaluée dans un premier temps. L'influence de la force ionique et de la condensation de Manning a ensuite été déterminée, selon les modèles de Friedl et Manning, respectivement. Les mobilités expérimentales ont été corrigées de ces deux effets, afin de mettre en évidence d'autres phénomènes éventuels, tels qu'un changement conformationnel de l'aptamère où des interactions entre l'aptamère et les constituants de l'électrolyte. Les constantes d'interaction ont finalement été calculées via des méthodes de linéarisation mathématique.

## 2. Article

# Interaction study of a lysozyme-binding aptamer with mono- and divalent cations by Affinity Capillary Electrophoresis

Marie Girardot, Pierre Gareil, Anne Varenne

*Electrophoresis* **2010**, 31, 546 – 555

Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences, UMR CNRS 7195, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris (Chimie ParisTech), 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris cedex 05, France

**Key words:** Affinity capillary electrophoresis / Aptamer / Conformation / Lysozyme / Manning's counterion condensation

**Non-standard abbreviations:** IS, ionic strength

## Abstract

Binding between an aptamer and its target is highly dependent on the conformation of the aptamer molecule, this latter seeming to be affected by a variety of cations. As only a few studies have reported on the interactions of monovalent or divalent cations with aptamers, we describe herein the use of ACE in its mobility shift format for investigating interactions between various monovalent ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) or divalent ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ) cations and a 30-mer lysozyme-binding aptamer. This study was performed in BGEs of different natures (phosphate and MOPS buffers) and ionic strengths. First, the effective charges of the aptamer in 30 mM ionic strength phosphate and MOPS (pH 7.0) were estimated to be 7.4 and 3.6, respectively. Then corrections for ionic strength and counterion condensation effects were performed for all studies. The effective mobility shift was attributed not only to these effects, but also to a possible interaction with the buffer components (binary or ternary complexes) as well as possible conformational changes of the aptamer. Finally, apparent binding constants were calculated for divalent cations with mathematical linearization methods, and the influence of the nature of the BGE was evidenced.

# 1 Introduction

Aptamers are single-stranded oligonucleotide sequences (ssDNA or RNA) which can have specific binding affinity to various targets ranging from small molecules to proteins, and even cells [1-3]. These synthetic molecules are isolated from random-sequence pools by a technique known as SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) or in vitro selection [4-6]. They are considered as a nucleic acid version of antibodies. Due to their distinctive properties, such as high affinity and increased thermal stability, tolerance to wide ranges of pH and salt concentration, low cost, small size, ease of synthesis and labelling, aptamers can be employed as sensitive diagnosis agents, biomedical research tools and even therapeutics [7-10].

Since many years, much attention has been paid to the investigation of divalent metal cations binding to DNA or more generally to oligonucleotides, in the presence or absence of monovalent counterions, because of the importance of this issue from both biological and theoretical viewpoint [11]. There are several potential binding sites for metal ions interacting with DNA, the more likely ones being the phosphate group and the N7 of the purine bases adenine and guanine [12]. It is generally acknowledged that “hard” cations, such as alkaline-earth and alkali ions preferentially bind to the phosphate groups, a phenomenon modeled by Manning’s counterion condensation (CC) theory [11, 13]. Alkali ions interact only with the negatively charged phosphate groups, whereas alkaline-earth ions can also bind to the aromatic bases, though they exhibit a higher affinity for the phosphate groups. “Soft” cations, such as transition metal ions, bind well to both sites [14]. The binding of cations to the polyanionic RNA has been extensively studied, showing that RNA folds can form specific pockets for tight binding of divalent cations. Thus the binding between an aptamer and its target, which is highly dependent on the conformation of the aptamer molecule, may be affected by a variety of cations [15-20]. For now, few studies were reported for the interaction between mono- or divalent cations and aptamers. High-resolution NMR studies showed that  $Mg^{2+}$  had a significant influence on the conformation of the free state of the adenine-sensing riboswitch aptamer [20]. By using electrochemical indicator methods and the quartz crystal microbalance (QCM) technique for detection of thrombin-aptamer interactions, some authors evidenced that increasing NaCl concentration resulted in weakening the binding of thrombin to its aptamer, probably due to a shielding of the negative charges or a change of the conformation of the binding site of the aptamer [21]. From another biosensor analysis, some

authors proposed the hypothesis of the increase in the number of active aptamers (in this case RNA aptamer to S-adenosylhomocysteine) in the presence of  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  by stabilizing one of several alternative conformations. Oligonucleotides with a G-rich sequence like thrombin-binding aptamer can form a higher ordered structure consisting of two or more G-quartets, called a G-quadruplex [22], which can be stabilized by various mono and divalent cations such as  $K^+$  [15, 16, 23],  $Ba^{2+}$  [15] or  $Sr^{2+}$  [23] and enhances the binding of the aptamer to the target. G-quadruplex formation was evidenced by several techniques, including mass spectrometry [24, 25], NMR spectroscopy [26], circular dichroism [23, 27, 28], and CE [15, 16]. Studies in free-solution CE [15] and CGE [16] showed that a 15-mer thrombin-binding aptamer can be separated into two peaks that correspond to the linear aptamer and the G-quartet structure in the presence of  $K^+$  in the separation buffer, the G-quartet form being the only one able to bind thrombin to form a complex. Study of aptamer-oligonucleotide binding by CE evidenced that mono- and divalent cations could impact the complex formation [17]. But no systematic study about the influence of mono- and divalent cations on the structure of the aptamers has been performed yet.

Methods for the quantitative characterization of nucleotide-metal ion interactions can be classified as mixture-based (spectroscopy, densimetry, potentiometry and calorimetry [29-31]), or separation-based (ultrafiltration, centrifugation, chromatography and electrophoresis). Among the different techniques available for studying biomolecular interactions, CE offers powerful attributes, making it very attractive and well adapted to the study of non-covalent complexes. The most common CE method used to estimate binding constants, ACE, involves measuring the change in electrophoretic mobility of a substrate through separation electrolytes containing various concentrations of ligand [32-34]. This method has appeared to be an efficient tool for studying DNA-metal ion interactions [35-37]. Interactions between short oligonucleotides (4 to 24 bases) and divalent metal cations have already been investigated by ACE [38, 39]. The choice of BGE components was shown to be critical as they can form binary or ternary complexes with DNA or/and metal ions. Binding constants were calculated and the results were rationalized in terms of a two-site binding model involving phosphate and nitrogen donors. Yet the authors did not attempt to correct the data for ionic strength, nor did they confront the results with the predictions of Manning's CC theory.

In this paper, we describe the use of ACE for investigating interactions between a lysozyme-binding aptamer and mono and divalent cations. This aptamer was selected through an automated SELEX method [40] and has been used to develop an aptamer-based biosensor

for the label-free voltammetric detection of lysozyme [41]. Yet no study has dealt with its characterization, as well as its interaction with cations or lysozyme.

The effects of an increasing concentration of monovalent and divalent cations in the BGE on the electrophoretic mobility of the lysozyme-binding aptamer were studied. In order to interpret the results, the effective charge of the aptamer was first assessed. Ionic strength and counterion condensation effects were then evaluated, according to Friedl's and Manning's models, respectively. The experimental mobilities were corrected for these two effects so as to evidence other possible phenomena, such as conformational changes of the aptamer or interaction with the buffer components. Binding constants were then calculated from mathematical linearizations.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Chemicals and reagents

All samples, solutions and buffers were prepared using analytical-grade chemicals. The lysozyme-binding aptamer was synthesized by Eurogentec France (Angers, France). The sequence of this 30-mer oligonucleotide is: 5'-ATC AGG GCT AAA GAG TGC AGA GTT ACT TAG-3'. Sodium chloride, potassium chloride, cesium chloride and standard 1 M NaOH solution Normadoses were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Magnesium chloride, calcium chloride, barium chloride, 3-(N-morpholine)propanesulfonic acid (MOPS), sodium monobasic phosphate, sodium dibasic phosphate, N,N-dimethylformamide, benzyl alcohol and hydroxypropyl cellulose (HPC,  $M_r$  100 000) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). All solutions were prepared with ultrapure water produced by a Direct-Q3 system (Millipore, Molsheim, France).

Phosphate buffer was composed of 7.2 mM sodium monobasic phosphate / 7.6 mM sodium dibasic phosphate (ionic strength (IS) = 30 mM, pH 7.0). MOPS buffers were composed of either 70 mM MOPS / 30 mM NaOH (I = 30 mM, pH 7.0) or 140 mM MOPS / 60 mM NaOH (IS = 60 mM, pH 7.0). Electrophoretic buffers containing a mono- or divalent cation at various concentrations (0 to 30 mM) were prepared by successive dilutions. When necessary, the appropriate quantity of NaCl was added to maintain a constant ionic strength. EOF marker was either N,N-dimethylformamide at 0.05% v/v in phosphate buffer or benzyl alcohol at 1% v/v in MOPS buffer.

### 2.2 Sample preparation

Stock solutions of lysozyme-binding aptamer (500 or 100  $\mu$ M in water) were stored at -18 °C prior to use. Unless otherwise specified, sample preparation consisted in incubation of 20  $\mu$ M aptamer in the BGE containing 1 mM of the studied cation, followed by a thermal treatment (5 min at 90 °C) and then cooling at ambient temperature for at least 30 min.

### 2.3 Capillaries and coatings

Bare fused-silica capillaries of 50  $\mu$ m i.d. (375  $\mu$ m o.d.) were purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). For HPC modification [42], a fused-silica capillary of 35 cm length was filled with the polymer solution (5 g/100 mL in water) using a syringe pump (KD Scientific, Holliston, USA). 15  $\mu$ L were percolated at a flow rate of 0.25

$\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  and then incubated at least for 2 hours to ensure better physisorption of the polymer onto the capillary wall. The filled capillary was purged with nitrogen (applied pressure, 4 bar) and then heated from 60 °C to 140 °C at 5 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ , held at 140 °C for 20 min and then cooled to 25 °C at 5 °C $\cdot\text{min}^{-1}$  in the oven of a ST 200 Stang Instruments gas chromatograph (Perichrom, Saulx-les-Chartreux, France), still under nitrogen flow. The detection window was made at 8.5 cm from the outlet by removing the polyimide layer with a blade, in order not to damage the polymer coating. Residual EOF was measured according to the method by Williams and Vigh [43]. Capillaries showing EOF mobility values greater than 1 to  $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  were discarded.

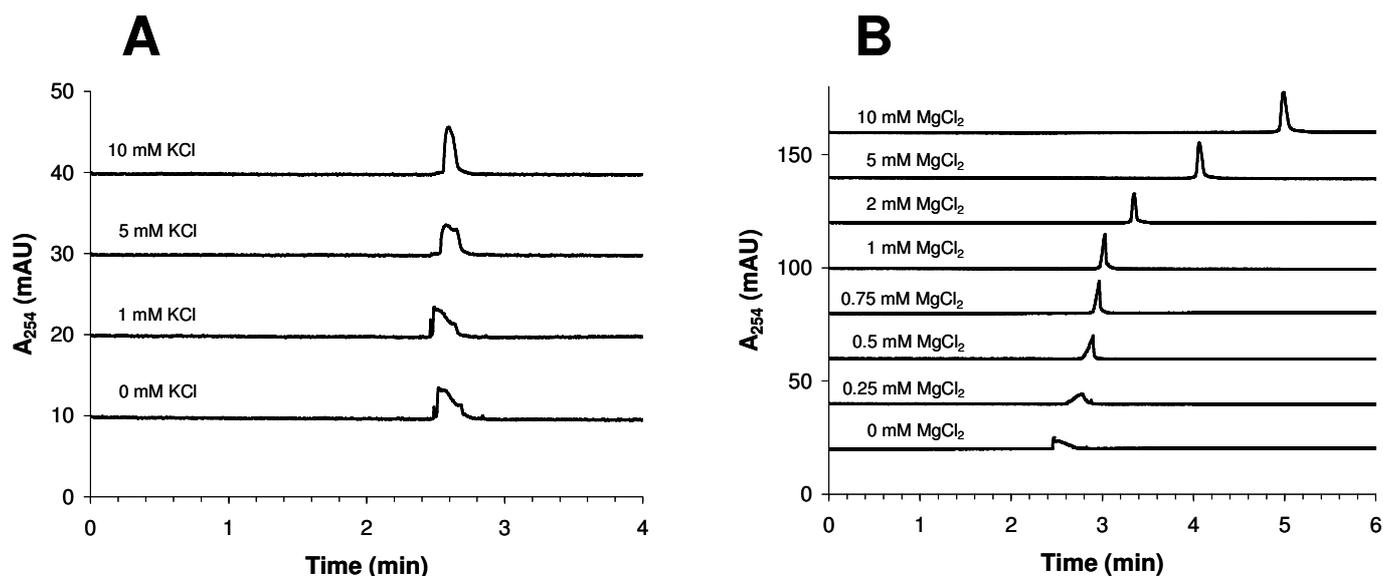
## 2.4 CE apparatus and measurements

Electrophoretic measurements were performed with a HP<sup>3D</sup>CE capillary electrophoresis system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector. Data were handled by an HPCChemstation software. 50  $\mu\text{m}$  id x 35 cm HPC-coated capillaries (detection length, 26.5 cm) were used. Successive hydrodynamic injections were performed at the capillary inlet in the following order: aptamer sample (30 mbar, 3 s) and electrophoretic buffer (30 mbar, 2 s). Separations were performed under a negative voltage of 10 kV (electric field, 285  $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) unless otherwise specified. The temperature of the capillary cartridge was set at 25 °C. In phosphate buffer, the detection wavelengths for EOF marker and aptamer were 200 and 254 nm, respectively. In MOPS buffers, the detection wavelength for both EOF marker and aptamer was 254 nm. The series of experiments consisted in successive injections of the aptamer sample in the separation electrolytes containing increasing concentrations of a mono- or divalent cation. Injections were repeated ( $n = 4$ ) to check the precision of the data. Two EOF measurements were performed prior to each repetition series in order to perform mobility corrections if necessary. Prior to each injection, the capillary was rinsed with electrophoretic buffer for 3 min under 925 mbar. For each different cation concentration, the capillary was beforehand equilibrated with electrophoretic buffer by rinsing for 10 min under the aforementioned pressure. The raw data were converted into Excel files, and the migration time was then determined by taking the first order moment of the data points defining the aptamer profile. Thus, the calculation of the mobility takes into account a possible distortion of the peak.

### 3 Results and discussion

ACE in its mobility shift format has been widely used to study analyte-ligand interactions. This method is a variant of zonal electrophoresis consisting in the injection of a small amount of the analyte of interest while the ligand is present in the background buffer. Provided that the analyte and the ligand have fast association-dissociation kinetics with respect to the migration velocity, and that the absolute mobilities of the free and bound forms of the analyte are different, then a shift in the position of the analyte peak is expected, as the ligand concentration in the background electrolyte varies. The shift in peak position can then be exploited to determine the strength of the interaction as well as the electrophoretic mobility of the complex formed [44, 45]. As the mono- and divalent cations are almost transparent in the whole accessible UV range, ACE was implemented by injecting and detecting the aptamer, the cations being dissolved in the separation electrolyte. The interaction studies were performed at pH 7.0 in both phosphate and MOPS BGEs of various IS (from 30 to 120 mM). In these conditions, the actual effective electrophoretic mobility (in absolute value) of the aptamer was quite identical to the electroosmotic mobility in bare fused-silica capillaries, leading to very high migration time values and broad peaks. Therefore, to ensure reliable mobility measurements of the aptamer, a capillary wall modification was performed with HPC, a hydrophilic neutral polymer which induces permanent capillary coating after thermal treatment and acts as EOF suppressor.

Figure 1 presents the electrophoretic profiles of the lysozyme-binding aptamer in 30 mM IS phosphate buffer (pH 7.0) containing different KCl (A) and MgCl<sub>2</sub> (B) concentrations. By increasing mono- or divalent cation concentration, the electrophoretic mobility of the aptamer decreases in absolute value. This is consistent with the increase in total ionic strength of the separation electrolyte. Furthermore, the peak obtained in the absence of MgCl<sub>2</sub> is rather broad and distorted. In view of these results, a systematic study was then performed (1) with different cations, either monovalent (alkali cations Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>) or divalent (alkaline earth cations Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>) and (2) in BGEs of different natures (phosphate or MOPS buffers, the counterion being Na<sup>+</sup> in both case) and ionic strengths. The evolution of the electrophoretic mobility in terms of cation nature and concentration was studied with respect to ionic strength and condensation effects and possible conformation change.



**Figure 1: Electrophoretic profiles of the lysozyme-binding aptamer in a 30 mM IS phosphate BGE (pH 7.0) containing various concentrations of (A) KCl and (B) MgCl<sub>2</sub>, as specified in the figure.**

Experimental conditions: 50  $\mu\text{m}$  i.d.x35 cm HPC-coated capillary (detection length, 26.5 cm). Applied voltage: -15 kV. Temperature: 25°C. Absorbance detection at 254 nm. Hydrodynamic injection (30 mbar, 3 s). Sample: 16.7  $\mu\text{M}$  lysozyme-binding aptamer in BGE containing (A) 1 mM KCl and (B) 1 mM MgCl<sub>2</sub>, with a thermal treatment (5 min at 90°C).

### 3.1 Evaluation of the effective charge of the lysozyme-binding aptamer

The lysozyme-binding aptamer is a 30-base ss-DNA. At neutral pH, deprotonation of the phosphate groups should lead to a maximum chemical charge rate of 30. Due to its high charge density, this polyanion is surrounded by an electrostatic field which traps the counterions present in the solution through a phenomenon known as “ion-binding” [46] or “counterion condensation”. According to Manning’s counterion condensation (CC) theory [11, 13], this electrostatic interaction with the counterions leads to a decrease of the effective charge of the polyion, which can be expressed as  $Z_{\text{eff}} = (1 - \theta)Z_{\text{max}}$ , where  $Z_{\text{eff}}$  is the effective charge of the polyion in the presence of the counterions,  $Z_{\text{max}}$  is the maximum charge predicted from chemical moieties, and  $\theta$  is the total fraction of charge neutralization. If the solution contains only one counterion species with valence  $Z$ , in large excess compared to the polyion, then  $\theta = 1 - 1/Z\xi$  [13], where  $\xi$  is the charge density parameter, the important parameter governing counterion binding. It is given by  $\xi = q^2/\epsilon k_B T b$ , where  $q$  is the protonic charge,  $\epsilon$  the dielectric constant,  $k_B$  the Boltzmann constant,  $T$  the absolute temperature in Kelvin and  $b$  the average axial charge spacing.

For double-stranded DNA in aqueous solutions,  $b = 1.7 \text{ \AA}$  [47, 48]; according to this value,  $\xi = 4.2$  at 25°C, which gives  $\theta = 0.76$  and 0.88 for monovalent ( $Z = 1$ ) and divalent ( $Z = 2$ ) counterions respectively. However, the charge spacing of a single-stranded

oligonucleotide is not so unambiguous, since this latter depends on the conformation of the molecule. For instance, Record et al reported that the axial charge spacing of single-stranded oligonucleotides increases with increasing pH [49]. Through a method based on the convective diffusion process, Kontturi and coworkers found that  $b$  was equal to 1.7 Å for a single-stranded oligonucleotide of 30 bases in a 0.15 M NaCl solution at 20°C (1.5 Å at 40°C) [50]. Thus, we chose to apply this value to the lysozyme-binding aptamer used in this study: if the BGE contains only monovalent cations (which is indeed the case for phosphate and MOPS buffers, in which sodium is at a concentration approximatively 1000 times higher than the aptamer), the effective charge of the lysozyme-binding aptamer should be 7.2. This calculation is consistent with current expectation for oligonucleotides in solution to have 75-80% of their phosphate groups condensed by counter-ions and to be in a fairly compact conformation [50].

### 3.2 Interaction of the lysozyme-binding aptamer with monovalent cations

We first studied the evolution of the electrophoretic mobility of the lysozyme-binding aptamer when a monovalent cation was added to the BGE. Three different alkali cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  or  $\text{Cs}^+$ ) were tested, and the influence of their nature was discussed.

#### 3.2.1 Influence of the nature of the monovalent cation

The electrophoretic mobility of the lysozyme-binding aptamer was determined in 30 mM IS phosphate buffer (pH 7.0) containing increasing concentration of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  or  $\text{Cs}^+$ . A similar behaviour occurs for all three cations, with a very slight difference in electrophoretic mobility, the actual mobility (in absolute value) increasing from  $\text{Na}^+$  to  $\text{K}^+$  and  $\text{Cs}^+$  (results not shown). For instance, at 30 mM monocation concentration in the BGE, the aptamer mobility (in absolute value) at 25°C is 35.0, 36.2 and  $38.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  for  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Cs}^+$  respectively. This is in accordance with other results showing that the electrophoretic mobility of DNA in the presence of alkali cation increases from  $\text{Li}^+$  to  $\text{Cs}^+$  [51, 52]. This trend may result from a decrease in phosphate shielding, which was explained by the authors either by the increasing ionic radius or the decreasing hydrodynamic radius [51]. Another hypothesis is that monovalent cations modify the free mobility of DNA by perturbing the hydrogen-bonded structure of water, thus affecting the friction experienced by the migrating DNA molecules during electrophoresis [52]. Furthermore, these observations are in agreement with Manning's theory of DNA electrophoresis [53], which predicts that DNA

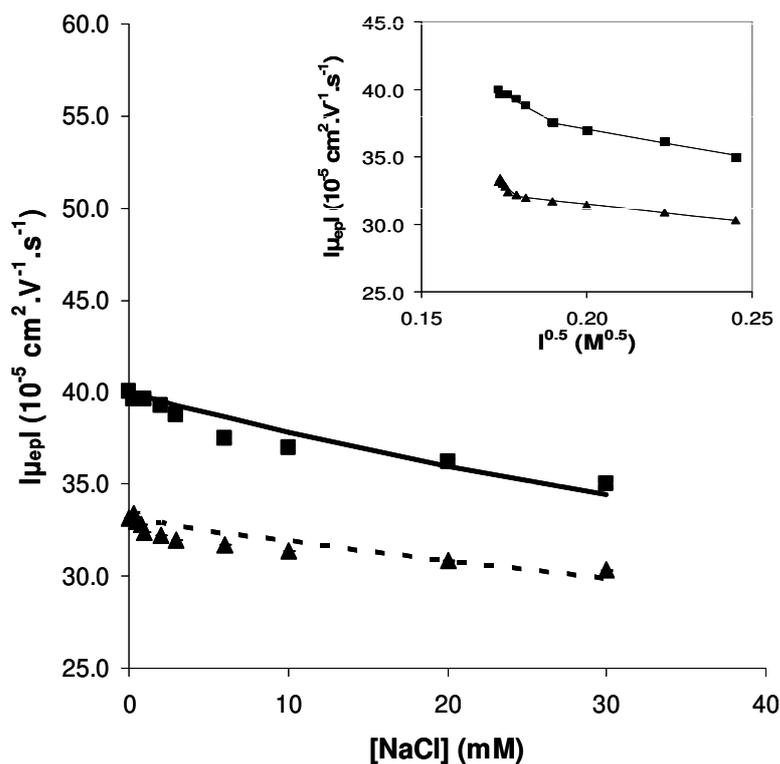
mobility should decrease linearly with the reverse limiting conductivity  $\lambda^\circ$  of the cation in the buffer (50.1, 73.5 and  $77.2 \times 10^{-4} \text{ m}^2 \cdot \text{S} \cdot \text{mol}^{-1}$  for  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Cs}^+$  at  $25^\circ\text{C}$  respectively [54]).

### 3.2.2 Ionic strength correction and determination of the aptamer effective charge

Figure 2 presents the experimental electrophoretic mobility shift in terms of  $\text{Na}^+$  concentration in phosphate (squares) and MOPS (triangles) BGEs (30 mM IS, pH 7.0). The addition of monovalent cation induces an increase in the BGE ionic strength, and thus a decrease in the effective mobility (in absolute value). An attempt to correct the experimental data for ionic strength was performed, by using Friedl's empirical equation [55]:

$$\mu_{\text{ep}}(I) = \mu_{\text{ep}}(I_0) \exp[0.77(zI_0)^{1/2}] \exp[-0.77(zI)^{1/2}] \quad (1)$$

where  $I_0$  is the initial BGE ionic strength,  $I$  the BGE ionic strength with a given additional concentration of cation, and  $z$  the charge number of the solute. This model is valid for anionic compounds with a valence number ranging between 1 and 6 and ionic strengths ranging between 0.001 and 0.1 M. According to Manning's theory for polyelectrolytes, an effective charge of 7.2 was previously calculated. The previous model was tentatively applied by employing an initial  $z$  value of 7.2, and the experimental points were then fitted to the model equation by using the method of least squares. The optimal effective charge that allowed the best fit was calculated as 7.4 in phosphate buffer (sum of squared residuals 2.912, RSD 0.395) and 3.6 in MOPS buffer (sum of squared residuals 2.406, RSD 0.205). It can be noted that the differences between the experimental and fitted curves accounting for IS effects are slight. Yet, the effective mobility is not a linear function of the square root of the ionic strength (insert): instead, two segments appear, one for the high concentration range of monocation (6-30 mM in phosphate,  $R^2=0.99$ ; 2-30 mM in MOPS,  $R^2=0.99$ ) and one with a poorer linearity for the low concentration range (0-6 mM in phosphate,  $R^2=0.97$ ; 0-2 mM in MOPS,  $R^2=0.82$ ). Thus, another phenomenon is likely to occur for cation concentrations lower than 6 mM in phosphate buffer and 2 mM in MOPS buffer, such as possible interactions with the buffer anions.



**Figure 2: Evolution of the electrophoretic mobility (in absolute value) of the lysozyme-binding aptamer in terms of NaCl concentration added in the BGE and the square root of the BGE ionic strength (insert).**

BGE (pH 7.0): 30 mM IS phosphate (squares) or 30 mM IS MOPS (triangles). Plain and dotted lines represent the plot of equation (1) for  $z = 7.4$  and  $z = 3.6$ , respectively. Equations of the least-squares regression straight lines for the insert : (■)  $y = -140.25x + 64.21$ ,  $R^2 = 0.97$  ( $0 < [\text{NaCl}] < 6 \text{ mM}$ ) and  $y = -43.85x + 45.83$ ,  $R^2 = 0.99$  ( $6 < [\text{NaCl}] < 30 \text{ mM}$ ); (▲)  $y = -209.94x + 69.64$ ,  $R^2 = 0.82$  ( $0 < [\text{NaCl}] < 2 \text{ mM}$ ) and  $y = -29.90x + 36.87$ ,  $R^2 = 0.99$  ( $2 < [\text{NaCl}] < 30 \text{ mM}$ ).

Experimental conditions: see Figure 1, except sample (20  $\mu\text{M}$  lysozyme-binding aptamer in BGE containing 1 mM of the studied cation).

### 3.2.3 Influence of the BGE nature on aptamer mobility and electrophoretic profiles

On comparing the electrophoretic profiles in both buffers, it appeared that MOPS gave rise to sharp and well defined peaks, whereas the peaks obtained in phosphate buffer were rather large and “spiky”. The peaks are getting sharper when the cation concentration increases, which can be attributed to a stacking effect due to the increasing difference between the cation concentration in the sample (1 mM) and in the separation buffer. Furthermore, the effective mobility (in absolute value) of the aptamer in the BGE without addition of a monovalent cation is around 25% higher in phosphate as compared to MOPS BGE ( $41.3$  versus  $33.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , respectively). It has to be noted that the initial  $\text{Na}^+$  concentrations in the neat BGEs are 22 mM and 30 mM, in phosphate and MOPS buffer, respectively. However, an addition of 8 mM NaCl in the phosphate buffer leading to a total  $\text{Na}^+$  concentration of 30 mM induces an effective mobility of  $37 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (in absolute value), which is still 12% higher than the mobility observed in MOPS buffer. This higher effective mobility (in absolute value) in phosphate buffer is consistent with the higher optimal

effective charge obtained previously (i.e. 7.4, as compared to 3.6 in MOPS buffer). This discrepancy can be explained by interactions occurring between the buffer components and the aptamer. Indeed, it has been reported that buffer components can form complexes with DNA [56] or metal-DNA complexes [57], thus leading to the formation of either binary (two-component) or ternary (three-component) complexes. MOPS has positively charged amino groups that can interact with the negatively charged phosphate groups of the aptamer to form a binary complex. In our opinion, this could lead to an increase of the weight (the charge remaining roughly the same because of the presence of sulfonate groups), and thus to a decrease of the effective mobility of the aptamer. Such binary complexes between amine-based buffers (of which MOPS) and DNA molecules were already evidenced [56]. In the case of phosphate buffer, a direct interaction is not favoured since phosphate ion and the aptamer are both negatively charged, but the formation of a ternary complex involving the cation, the aptamer and the phosphate anion can be contemplated, thus leading to an increase in the charge to mass ratio, and hence in effective mobility. In addition, the electrophoretic profiles obtained in phosphate buffer are rather broad and irregular, as it was also observed for DNA in Tris-borate-EDTA (TBE) buffer [58]. This could reflect the presence of a mixture of conformations for the aptamer due to its different possible interactions with the buffer components. Thus, an hypothesis that could explain both for the difference in electrophoretic mobilities and profiles could be the formation of a binary complex between the aptamer and the buffer zwitterion (in the case of MOPS buffer), or a ternary complex between the aptamer, the cation and the buffer anion (in the case of phosphate buffer). Concerning aptamers, some authors showed that monovalent cations such as  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  or  $\text{Cs}^+$  can form weak complexes with the thrombin-binding aptamer, and thus probably weakly influence the aptamer conformation [21]. In the case of the lysozyme-binding aptamer, the mobility shift in the presence of monovalent cations seems mainly due to the ionic strength increase, with a possible additional complex formation involving some buffer components.

### 3.3 Interaction of the lysozyme-binding aptamer with divalent cations

We then studied the evolution of the electrophoretic mobility of the lysozyme-binding aptamer upon adding a divalent cation to the BGE. Three different alkaline earth cations ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Ba}^{2+}$ ) were tested, and the influence of their nature was discussed.

### 3.3.1 Influence of the nature of the divalent cation

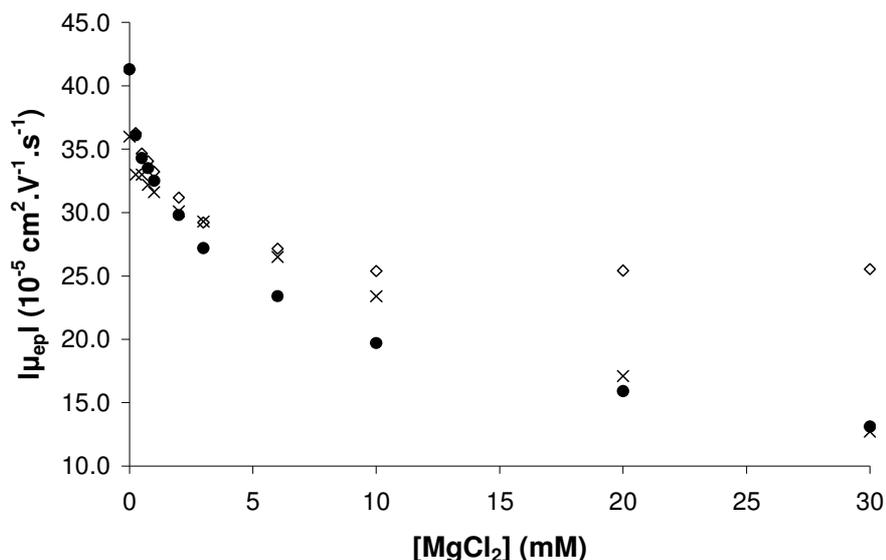
The electrophoretic mobility of the lysozyme-binding aptamer was determined in the presence of increasing concentrations of divalent cations ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Ba}^{2+}$ ). It has to be noted that  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  have a low solubility in phosphate buffer, so these two cations were studied only in MOPS buffer. For  $\text{Mg}^{2+}$ , the electrophoretic profiles appeared identical in 30 mM IS phosphate and MOPS buffers, excepted for the BGE devoid of divalent cation, as already observed in the study with monovalent cations. Furthermore, the evolution of the effective mobility is similar for each cation in MOPS (60 mM initial IS, pH 7.0), but its value increases from  $\text{Mg}^{2+}$  to  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  (results not shown): for instance, with a 30 mM dication concentration, the aptamer mobilities (in absolute value) are  $14.5$ ,  $15.7$  and  $16.7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  for  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  respectively. As for alkali ions, this order is in keeping with that of ionic radii [51, 52] and in accordance with the prediction of Manning's theory of DNA electrophoresis [53].

### 3.3.2 Ionic strength and counterion condensation effects

As previously stated, the variation of the aptamer effective mobility in the presence of a cation could be due to ionic strength effect, counterion condensation, complexation with a buffer component or conformation changes, some of these phenomena being linked.

Figure 3 (filled circles) shows the variation of the electrophoretic mobility of the lysozyme-binding aptamer with increasing concentration of  $\text{MgCl}_2$  in 30 mM IS phosphate buffer (pH 7.0). IS effect can either be eliminated by correcting the experimental data using the model previously described (Eq 1) or by keeping a constant ionic strength for the different BGEs with addition of various concentrations of NaCl. In the first case, the corrected mobility  $\mu_{\text{corr}}$  is calculated from the initial mobility  $\mu_0$  (i.e. without any dication in the BGE) by adding the corrective term  $\mu_{\text{exp}} - \mu_{\text{calc}}$ , where  $\mu_{\text{exp}}$  is the experimental mobility and  $\mu_{\text{calc}}$  the mobility calculated from Eq 1:  $\mu_{\text{corr}} = (\mu_{\text{exp}} - \mu_{\text{calc}}) + \mu_0$ . The ionic strength correction was made by using either the effective charge value of 7.2 or the optimal charge density determined in the presence of monovalent cation (i.e. 7.4 in phosphate buffer or 3.6 in MOPS buffer, results not shown). Using this approach, the corrected mobility reaches a plateau at 10 mM divalent cation concentration (Figure 3, open diamonds). The same behaviour was observed in MOPS BGE (results not shown). On employing phosphate-based BGE at total constant ionic strength (120 mM, i.e. the ionic strength attained when the BGE was composed of 30 mM IS phosphate buffer and 30 mM  $\text{MgCl}_2$ ), no IS correction was needed. In this case, the

electrophoretic mobility keeps decreasing in the whole dication concentration range (Figure 3, crosses).



**Figure 3: Evolution of the electrophoretic mobility (in absolute value) of the lysozyme-binding aptamer in terms of MgCl<sub>2</sub> concentration added to phosphate BGEs (pH 7.0).**

Filled circles: experimental values for 30 mM initial IS BGE. Open diamonds: corrected values for constant ionic strength (30 mM) using equation 1 with  $z = 7.2$ . Crosses: experimental values for constant 120 mM total IS BGE. Experimental conditions: see Figure 2.

Concerning counterion condensation, the aptamer effective mobility (in absolute value), at a similar ionic strength, is inferior with the addition of a divalent cation, as compared to a monovalent cation: in 30 mM IS phosphate buffer (pH 7.0), the aptamer mobility (in absolute value) is  $35 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  when 30 mM NaCl is added and  $20 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  when 10 mM MgCl<sub>2</sub> is added, while the total ionic strength is the same (i.e. 60 mM). This observation seems in good agreement with Manning's condensation theory that states that the electrophoretic mobility should be divided by two when comparing divalent to monovalent cations, as  $Z_{\text{eff}}$  is divided by two. Yet it has to be noted that each of the BGEs employed contain both monovalent (Na<sup>+</sup>, composing the initial BGE at a constant concentration) and divalent counterions (added at different concentrations) that compete for binding of the polyanion, resulting in a more complex system which is well depicted by Manning's two-variable CC theory [13, 47, 48].

An attempt to estimate the mobility variation due to counterion condensation was then performed, based on the calculation of the fraction of charge neutralization in terms of divalent cation concentration, via Manning's two-variable CC model. The total charge neutralization fraction of the polyion is  $\theta = \theta_1 + 2\theta_2$ , where  $\theta_1$  and  $\theta_2$  are the fraction of charge

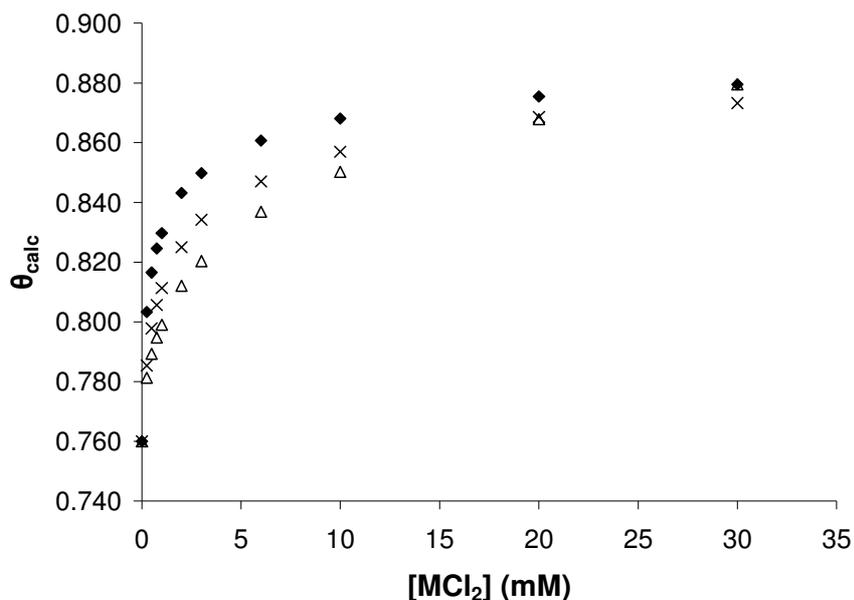
neutralized by monovalent and divalent cations respectively.  $\theta_1$  and  $\theta_2$  can be calculated by the following equations:

$$1 + \ln(1000 \theta_1 / C_1 V_{p1}) = -2\xi(1 - \theta_1 - 2\theta_2) \ln(1 - e^{-\kappa b}) \quad (2)$$

$$\ln(\theta_2 / C_2) = \ln(V_{p2} / 1000e) + 2 \ln(1000 \theta_1 e / C_1 V_{p1}) \quad (3)$$

$C_1$  and  $C_2$  refer to the molar concentrations of monovalent and divalent cations respectively,  $\kappa$  is the reciprocal Debye length,  $e$  is the base of natural logarithms,  $V_{p1}$  and  $V_{p2}$  refer to the volume per mole phosphate within which the counterions are considered territorially bound. Under the assumption that the counterions are at infinite dilution, the calculation for  $V_{pz}$  is given by:  $V_{pz} = 4\pi e N_a (1+Z) (\xi - Z^{-1}) b^3$ , where  $Z$  is the valence of the cation and  $N_a$  Avogadro's number [11].

For each concentration of divalent cation, this two-equation system (Equations 2 and 3) was solved using the Excel software to determine the total charge neutralization fraction. Figure 4 shows the variation of the calculated global neutralization fraction ( $\theta_{calc}$ ) in terms of divalent cation concentration in phosphate buffer of various ionic strengths: BGE1 (30 mM initial IS), BGE2 (60 mM initial IS) and BGE3 (120 mM constant IS). In BGE1 ( $[Na^+]/[M^{2+}]$  ratio ranging from 88 to 0.73),  $\theta$  reaches a plateau value at 0.88 for 20 mM divalent cation concentration ( $[Na^+]/[M^{2+}] = 1.1$ ), which is the calculated  $\theta$  value in the presence of a divalent cation only (Figure 4, filled diamonds). In these conditions, the condensation effect seems to be principally due to the divalent cation. In BGE2 ( $[Na^+]/[M^{2+}]$  ranging from 176 to 1.47),  $\theta$  is slightly lower than in BGE1 and keeps increasing in the dication concentration range (Figure 4, crosses), since the  $[Na^+]/[M^{2+}]$  value for which the effect of the divalent cation becomes prevalent is not reached within the dication concentration range. In BGE3 ( $[Na^+]/[M^{2+}]$  ranging from 445 to 0.73),  $\theta$  is lower (Figure 4, open triangles), except for 30 mM  $M^{2+}$  where it reaches the same value as in BGE1 since the ratio  $[Na^+]/[M^{2+}]$  is the same (i.e. 0.73). No plateau for  $\theta$  is reached in these conditions, which can be connected with the evolution of the effective mobility, which keeps increasing within the dication range as well. Thus a higher ionic strength leads to lower  $\theta$  values, which is consistent with previous studies [47] and can be explained by the higher NaCl concentration leading to an equilibrium displacement. Indeed if  $\theta$  is plotted versus  $[Na^+]/[M^{2+}]$  instead of  $[M^{2+}]$ , the evolution is identical in all three BGEs.



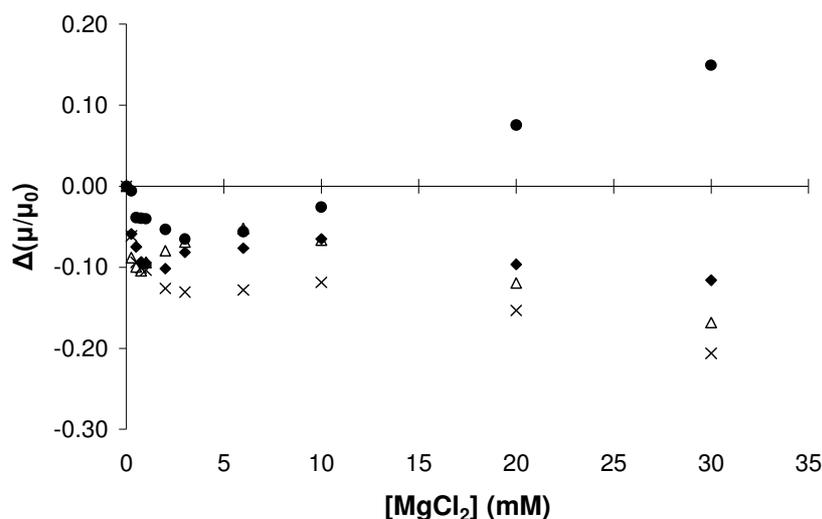
**Figure 4: Variation of the calculated total charge neutralization fraction with the concentration of a divalent cation in phosphate buffers of various IS, according to Manning's two variable CC model.**

Phosphate BGE (pH 7.0): 30 mM initial IS (♦), 60 mM initial IS (×) or 120 mM constant IS (Δ).

So as to better visualize the CC effect, predicted and experimental mobility reduction can be calculated. Assuming Henry's model to be obeyed, the mobility of DNA at constant ionic strength depends only upon its residual charge, and the mobility reduction  $\mu/\mu_0$  resulting from the addition of a divalent cation into the initial BGE containing only monovalent cations can be predicted by:  $\mu/\mu_0 = (1-\theta)(1-\theta_0)$  where  $\mu_0$  and  $\theta_0$  refer to the mobility and charge condensation rate in the initial BGE ( $\theta_0 = 0.76$ ), and  $\theta$  is the charge condensation rate calculated previously for a given addition of divalent cation. These ratios can be confronted to the experimental mobility reduction ratios  $\mu_{\text{exp}}/\mu_0$  calculated from experimental mobility values  $\mu_{\text{exp}}$  corrected from IS (the value of effective charge used being 7.2 for consistency with  $\theta_0$  value).

The difference between the predicted mobility reduction and the experimental one ( $\Delta(\mu/\mu_0) = \mu/\mu_0 - \mu_{\text{exp}}/\mu_0$ ) was studied in terms of the divalent cation concentration for various BGEs. Figure 5 plots the results obtained in the case of  $\text{Mg}^{2+}$  in phosphate (30 mM initial IS and 120 mM constant IS, filled diamonds and filled circles respectively) and MOPS buffers (30 mM and 60 mM initial IS, open triangles and crosses, respectively). In 30 mM or 60 mM initial IS MOPS (pH 7.0),  $\Delta(\mu/\mu_0)$  is negative for all three dications, which means that the experimental mobility is greater in absolute value than the predicted one. This seems to indicate that IS and CC corrections cannot totally explain the mobility evolution. The difference increases (1) with cation concentration, very quickly from 0 to 5 mM and then more slowly, (2) with the ionic strength from 30 mM to 60 mM ( $\Delta(\mu/\mu_0) = -0.17$  and  $-0.21$  in

30 and 60 mM IS MOPS buffer respectively, for 30 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ) and (3) from  $\text{Mg}^{2+}$  to  $\text{Ba}^{2+}$  ( $\Delta(\mu/\mu_0) = -0.21, -0.23$  and  $-0.27$  for  $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  respectively, in 60 mM IS MOPS buffer (pH 7.0) for 30 mM dication). The same evolution is observed in 30 mM IS phosphate buffer (pH 7.0), but the difference is a little greater in MOPS than in phosphate buffer ( $-0.17$  against  $-0.12$  respectively, for 30 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ). In the 120 mM constant IS phosphate buffer, the behavior is strongly modified:  $\Delta(\mu/\mu_0)$  decreases from 0 to 3 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , then increases and becomes positive at 20 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , reaching 0.15 at 30 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . These discrepancies between predicted and experimental mobilities could reveal interactions with other components that could lead to a conformation modification of the aptamer. This shift between predicted and experimental mobilities is more pronounced in MOPS than in phosphate BGE. Furthermore, as in the case of monocations, the electrophoretic profiles obtained are broader and more poorly defined in phosphate buffer than in MOPS buffer. This can be again correlated to the hypothesis of the formation of binary or ternary complexes, the stability seeming higher for the binary complexes. Such an interaction can lead to a change of structure or a mixture of conformations of the aptamer.



**Figure 5:** Difference between predicted and experimental mobility reduction ( $\Delta(\mu/\mu_0)$ ) in terms of  $\text{MgCl}_2$  concentration in BGEs (pH 7.0) of different natures and ionic strengths. 30 mM initial IS phosphate ( $\blacklozenge$ ), 120 mM constant IS phosphate ( $\bullet$ ), 30 mM initial IS MOPS ( $\triangle$ ) or 60 mM initial IS MOPS ( $\times$ ). Experimental conditions: see Figure 2.

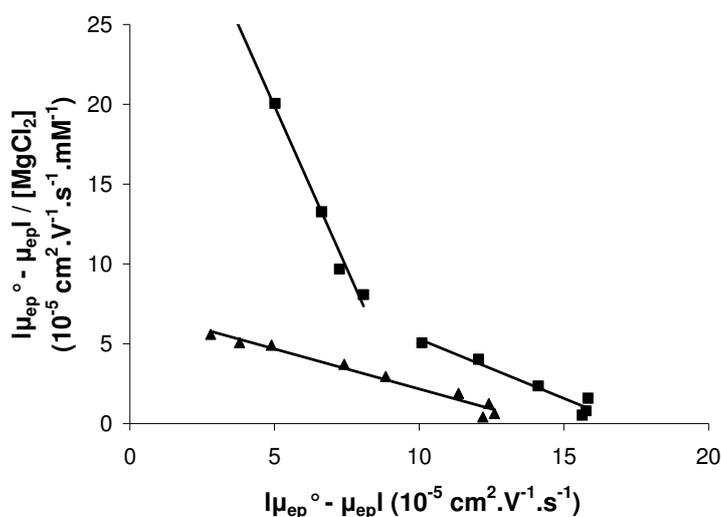
### 3.4 Determination of interaction constants for divalent cations

For each ACE study, the binding isotherm for the aptamer-divalent cation systems can be drawn under the form of the aptamer electrophoretic mobility plot in function of dication concentration in the BGE. Detailed theoretical treatments and discussions on experimental methods for estimation of interaction constants can be found in the literature [44, 45]. The

binding isotherm equation can be transformed into linearized forms, such as linearized isotherm, x-reciprocal, y-reciprocal and double reciprocal forms [44, 45, 59]. The results herein are presented as the average  $K_d$  values obtained by the four linearization methods. The x-, y- and double-reciprocal methods allowed to calculate the actual mobility of the fully complexed aptamer as well, which was found similar to the mobility obtained experimentally in BGEs with the highest dication concentration.

### 3.4.1 Determination of dissociation constants with $Mg^{2+}$ according to BGE composition

In the case of  $Mg^{2+}$ , determination was performed in both phosphate and MOPS buffers, at different IS: 30 mM initial IS or 120 mM IS for phosphate buffer, 30 and 60 mM initial IS for MOPS buffer. In all cases, a linear plot was obtained with the isothermal, y-reciprocal and double-reciprocal methods. However, the Scatchard plot (x-reciprocal method) presented two different tendencies, depending on the buffer: whereas it was linear over the entire concentration range in the MOPS buffer, in phosphate buffer it exhibited two different linear segments, leading to different  $K_d$  values for each concentration range (Figure 6).



**Figure 6: Scatchard plot (x-reciprocal method) for the lysozyme-binding aptamer /  $Mg^{2+}$  system in MOPS and phosphate BGEs (30 mM initial IS, pH 7.0).**

BGE ( $I = 30$  mM, pH 7.0): MOPS ( $\blacktriangle$ ) or phosphate ( $\blacksquare$ ).  $\mu_{ep}^{\circ}$  is the mobility of the aptamer (in absolute value) in the absence of  $Mg^{2+}$  in the BGE. Equations of the least-squares regression straight lines ( $n=9$ ): ( $\blacktriangle$ )  $y = -0.50x + 7.16$ ,  $R^2 = 0.97$ ; ( $\blacksquare$ )  $y = -1.48x + 22.6$ ,  $R^2 = 0.82$ ;  $y = -4.07x + 40.2$ ,  $R^2 = 0.98$  ( $0.25 < [MgCl_2] < 1$  mM);  $y = -0.63x + 11.4$ ,  $R^2 = 0.99$  ( $2 < [MgCl_2] < 10$  mM)

At high dication concentration ( $10\text{--}15 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  on the abscissa), the slopes of the Scatchard plots are similar in both MOPS and phosphate buffers ( $-0.50$  and  $-0.63 \text{ mM}^{-1}$  in MOPS and phosphate, respectively), which means that the aptamer interacts in the same way with the divalent cation (similar  $K_d$ ). At low dication concentration ( $2.5\text{--}8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  on

the abscissa), the slope is higher in phosphate than in MOPS buffer ( $-4.07$  versus  $-0.50 \text{ mM}^{-1}$ ), which reflects a stronger interaction between the aptamer and the dication (smaller  $K_d$ ). This may indicate the presence of sites of stronger energy on the aptamer. In MOPS buffer, it can be assumed that a competition occurs between the dication and the MOPS zwitterion for the binding with the aptamer; the complexation with MOPS would lead to steric hindrance, thus blocking the stronger site of the aptamer. In phosphate buffer, the formation of a ternary complex aptamer/dication/phosphate could stabilize these sites (the dication being sandwiched between two phosphate residues) and favour the interaction. Table 1 summarizes the  $K_d$  values obtained in the different buffers, either with or without ionic strength correction employing the optimal charge density, i.e. 3.6 in MOPS or 7.4 in phosphate. It occurs from the results that  $K_d$  values increase with buffer ionic strength, which reflects the interaction is mainly ionic, since Manning's condensation theory predicts that  $\theta$  (total fraction neutralization) value decreases when IS increases. It can be noted that  $K_d$  values obtained after IS correction are slightly lower than those obtained without IS correction, which is consistent with the fact that the plateau is reached for lower  $\text{Mg}^{2+}$  concentration when the IS effect is removed.

**Table 1: dissociation constants ( $K_d$ ) in mM for the lysozyme-binding aptamer /  $\text{Mg}^{2+}$  system in various BGEs.**

Electrolyte	Sodium phosphate buffer	Sodium phosphate buffer + NaCl	Sodium MOPS buffer	
Initial ionic strength	30 mM	120 mM (constant)	30 mM	60 mM
Condition 1 : no IS correction	$K_d = 1.8 \pm 0.9$ (a) $K_{d1} = 0.3 \pm 0.0$ (0 to 1 mM $\text{Mg}^{2+}$ ) $K_{d2} = 3.5 \pm 0.5$ (2 to 30 mM $\text{Mg}^{2+}$ )	$K_d = 5.3 \pm 2.5$ $K_{d1} = 1.0 \pm 0.0$ (0 to 2 mM $\text{Mg}^{2+}$ ) $K_{d2} = 12.1 \pm 2.8$ (3 to 30 mM $\text{Mg}^{2+}$ )	$K_d = 3.1 \pm 0.2$	$K_d = 5.8 \pm 0.5$
Condition 2 : IS correction with $z=z_{\text{opt}} = 3.6$ in MOPS or 7.4 in phosphate	$K_d = 0.6 \pm 0.1$ $K_{d1} = 0.2 \pm 0.0$ (0 to 1 mM $\text{Mg}^{2+}$ ) $K_{d2} = 1.2 \pm 0.3$ (2 to 30 mM $\text{Mg}^{2+}$ )	N/A	$K_d = 1.7 \pm 0.4$	$K_d = 3.2 \pm 0.2$

(a) The confidence interval given corresponds to 4 measurements.

### **3.4.2 Determination of dissociation constants with different divalent cations in MOPS buffer**

The  $K_d$  values obtained for the three divalent cations in 60 mM IS MOPS buffer (pH 7.0) with ionic strength correction employing the optimal effective charge number (i.e. 3.6 in MOPS) were  $3.2 \pm 0.2$ ,  $3.9 \pm 0.4$  and  $5.9 \pm 2.1$  mM for  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Ba^{2+}$  respectively. If we consider that the dications interact only with the phosphate groups (i.e. Manning's condensation is the only phenomenon occurring), these results mean that the affinity of dications for phosphate residues decreases from  $Mg^{2+}$  to  $Ba^{2+}$ . This result has to be related to the difference of aptamer mobility in the presence of these various cations, which showed that the shielding of the phosphate decreases from  $Mg^{2+}$  to  $Ba^{2+}$ .

## 4 Concluding remarks

In this work, ACE was used to study the interactions of the lysozyme-binding aptamer with both monovalent and divalent cations in various BGEs. An empirical model for ionic strength correction on mobilities was applied so as to determine the effective charge of the aptamer. When a monovalent cation was added to the BGE, the mobility shift observed was attributed mainly to the increase of the ionic strength. We also evidenced the influence of the nature of the BGE on mobility and electrophoretic profiles, which was interpreted in terms of possible interaction of the aptamer and/or the cation with the buffer components.

When a divalent cation was added, the mobility shift was found to be greater than when adding monovalent cations, which was linked to the counterion condensation phenomenon occurring in a system containing both monovalent and divalent cations. The experimental data were corrected in terms of ionic strength by using the empirical model, and in terms of counterion condensation by resolving the Manning's two-variable system. Data were then compared by calculating the difference between the predicted and the experimental mobility reduction, showing a discrepancy that might be related to a conformational change of the aptamer. Finally, binding constants of the lysozyme-binding aptamer with divalent cations were determined through mathematical linearizations.

Further study will investigate the interaction between the lysozyme-binding aptamer and its target in order to provide new insights into the influence of buffer components and cations on possible conformation change and thus on interaction strength.

### 3. Conclusion

La reconnaissance de la cible par l'aptamère met en jeu un certain nombre d'interactions (interactions électrostatiques ou d'empilement, liaisons hydrogène) et dépend donc fortement de la conformation de l'aptamère. Celle-ci peut être influencée par l'environnement, et notamment par la présence de divers cations. Nous avons donc choisi d'étudier par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) l'interaction entre un aptamère et divers cations monovalents (sodium, potassium, césium) ou divalents (magnésium, calcium, baryum), afin de mettre en évidence un éventuel changement de conformation de l'aptamère, pouvant influencer sur l'interaction aptamère-cible.

Pour cela, un aptamère ADN de 30 bases dirigé contre une cible protéique, le lysozyme, a été injecté dans un électrolyte de séparation contenant une concentration croissante de cation. Les variations de la mobilité électrophorétique de l'aptamère en fonction de la concentration en cation dans l'électrolyte ont été interprétées en termes de variation de force ionique et de condensation de contre-ions (théorie de Manning). Les corrections ainsi apportées aux données expérimentales ont permis de mieux comprendre les phénomènes impliqués dans l'interaction aptamère/cation.

Dans le cas des monocations, la mobilité effective de l'aptamère semble principalement influencée par la force ionique ainsi que par la nature de l'électrolyte de séparation, ce qui suggère l'existence d'interactions entre l'aptamère et le co-ion de l'électrolyte (complexe binaire ou ternaire). En présence de dications, l'évolution de la mobilité effective est liée aux effets de force ionique et de condensation de contre-ions, ainsi qu'à d'autres phénomènes tels que la complexation avec les constituants de l'électrolyte et/ou un possible changement de conformation de l'aptamère. Enfin, les constantes d'affinité apparentes entre l'aptamère et les différents dications ont été déterminées en traitant les résultats par des méthodes de linéarisation mathématique, afin d'appuyer les hypothèses précédemment décrites.

Ces travaux ont été complétés par la caractérisation de l'aptamère par spectrométrie de masse via un couplage CE/ESI-MS (Annexe 1) ainsi que par une étude par analyse frontale de l'interaction aptamère-magnésium (Annexe 2). L'interaction entre l'aptamère anti-lysozyme et sa cible, qui fait l'objet du chapitre IV, vise à mieux comprendre l'influence des constituants de l'électrolyte et des cations sur la conformation de l'aptamère, et donc sur les paramètres de l'interaction (constante d'affinité et stoechiométrie).

## 4. Références bibliographiques

- [1] Famulok, M., Mayer, G., Blind, M., *Acc. Chem. Res.* 2000, 33, 591-599.
- [2] Jayasena, S. D., *Clin. Chem.* 1999, 45, 1628-1650.
- [3] Mairal, T., Özalp, V. C., Sánchez, P. L., Mir, M., *et al.*, *Anal. Biochem.* 2008, 390, 989-1007.
- [4] Stoltenburg, R., Reinemann, C., Strehlitz, B., *Biomol. Engineering* 2007, 24, 381-403.
- [5] Hamula, C. L. A., Guthrie, J. W., Zhang, H., Li, X.-F., Le, X. C., *Trends Anal. Chem.* 2006, 25, 681-691.
- [6] Sampson, T., *World Patent Information* 2003, 25, 123-129.
- [7] Mosing, R. K., Bowser, M. T., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 1420-1426.
- [8] Famulok, M., Hartig, J. S., Mayer, G., *Chem. Rev.* 2007, 107, 3715-3743.
- [9] Ravelet, C., Grosset, C., Peyrin, E., *J. Chromatogr. A* 2006, 1117, 1-10.
- [10] Song, S., Wang, L., Li, J., Zhao, J., Fan, C., *Trends Anal. Chem.* 2008, 27, 108-117.
- [11] Manning, G. S., *Biophys. Chem.* 1977, 7, 95-102.
- [12] Egli, M., *Curr. Opin. Biotechnol.* 2004, 8, 580-591.
- [13] Manning, G. S., *Q. Rev. Biophys. Chem.* 1978, 11, 178-246.
- [14] Sissoëff, I., Grisvard, J., Guillé, E., *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 1976, 31, 165-199.
- [15] Huang, C.-C., Chang, H.-T., Cao, Z., Tan, W., *Anal. Chem.* 2004, 76, 6973-6981.
- [16] Szilagy, A., K. Bonn, G., Guttman, A., *J. Chromatogr. A* 2007, 1161, 15-21.
- [17] Guillaume, Y.-C., André, C., Xicluna, A., *Electrophoresis* 2005, 26, 3247-3255.
- [18] Clark, S. L., Remcho, V. T., *Anal. Chem.* 2003, 75, 5692-5696.
- [19] Gebhardt, K., Shokraei, A., Babaie, E., Lindqvist, B. H., *Biochem.* 2000, 39, 7255-7265.
- [20] Wöhnert, J., Noeske, J., Schwalbe, H., *Nucl. Acids res.* 2007, 35, 5262-5273.
- [21] Hianik, T., Veronika Ostatná, Sonlajtnerova, M., Grman, I., *Bioelectrochem.* 2007, 70, 127-133.
- [22] Keniry, M. A., *Biopolymers (Nucleic Acids Sciences)* 2001, 56, 123-146.
- [23] Marky, L. A., Kankia, B. I., *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 10799-10804.
- [24] Vairamani, M., Gross, M. L., *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 42-43.
- [25] Wilcox, J. M., Rempel, D. L., Gross, M. L., *Anal. Chem.* 2008, 80, 2365-2371.
- [26] Baldrich, E., O'Sullivan, C. K., *Anal. Biochem.* 2005, 341, 194-197.
- [27] Tsumoto, K., Nagatoishi, S., Tanaka, Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2007, 352, 812-817.
- [28] Bates, P. J., Dapic, V., Abdomerovic, V., Marrington, R., *et al.*, *Nucl. Acids res.* 2003, 31, 2097-2107.
- [29] Fuente, M., Hernanz, A., Navarro, R., *J. Biol. Inorg. Chem.* 2004, 9, 973-986.
- [30] Kankia, B. I., *Biopol.* 2004, 74, 232-239.
- [31] Sigel, H., Griesser, R., *Chem. Soc. Rev.* 2005, 34, 875-900.
- [32] Whitesides, G. M., Colton, I. J., Carbeck, J. D., Rao, J., *Electrophoresis* 1998, 19.
- [33] Frank, J., Rippel, G., Corstjens, H., Billiet, H. A. H., *Electrophoresis* 1997, 18, 2175-2183.
- [34] Heegaard, N. H. H., Nilsson, S., Guzman, N. A., *J. Chromatogr. B* 1998, 715, 29-54.
- [35] Arakawa, H., Neault, J. F., Tajmir-Riahi, H. A., *Biophys. Journal* 2001, 81, 1580-1587.
- [36] Ahmad, R., Arakawa, H., Tajmir-Riahi, H. A., *Biophys. Journal* 2003, 84, 2460-2466.
- [37] Tajmir-Riahi, H. A., Ouameur, A., Ahmed Arakawa, H., Ahmad, R., Naoui, M., *DNA Cell Biol.* 2005, 24, 394-401.
- [38] Stettler, A. R., Chaurin, V., Constable, E. C., Housecroft, C. E., Schwarz, M. A., *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007, 12, 194-203.

- [39] Stettler, A. R., Chaurin, V., Constable, E. C., Housecroft, C. E., Schwarz, M. A., *Electrophoresis* 2008, 29, 3342-3348.
- [40] Cox, J. C., Ellington, A. D., *Bioorg. Med. Chem.* 2001, 9, 2525-2531.
- [41] Cheng, A. K. H., Ge, B., Yu, H.-Z., *Anal. Chem.* 2007, 79, 5158-5164.
- [42] Smith, R. D., Shen, Y., *J. Microcol. Sep.* 1999, 12, 135-141.
- [43] Williams, B. A., Vigh, G., *Anal. Chem.* 1996, 68, 1174-1180.
- [44] Rundlett, K. L., Armstrong, D. W., *J. Chromatogr. A* 1996, 721, 173-176.
- [45] Rundlett, K. L., Armstrong, D. W., *Electrophoresis* 1997, 18, 2194-2202.
- [46] Nagasawa, M., in: Selegny, E. (Ed.), *Polyelectrolytes*, Reidel, Dorcrecht 1974, pp. 57-77.
- [47] Marx, K. A., Li, A. Z., Huang, H., Re, X., Qi, L. J., *Biophys. Journal* 1998, 74, 964-973.
- [48] Bloomfield, V. A., Wilson, R. W., *Biochem.* 1979, 18, 2192-2196.
- [49] Record, M. T., Jr.; Woodbury, C. P., Lohman, T. M., *Biopol.* 1976, 15, 893-915.
- [50] Kontturi, A.-K., Kontturi, K., Urtti, A., *Eur. J. Pharm. Sci.* 2002, 15, 379-385.
- [51] Righetti, P. G., Magnusdottir, S., Gelfi, C., Perduca, M., *J. Chromatogr. A* 2001, 920, 309-316.
- [52] Stellwagen, N. C., Stellwagen, E., Dong, Q., *Biopol.* 2005, 78, 62-68.
- [53] Manning, G. S., *J. Phys. Chem.* 1981, 85, 1506-1515.
- [54] in: Weast, R. C. (Ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 65th edition*, CRC Press, Boca Raton, FL 1984, pp. D171-D172.
- [55] Friedl, W., Reijenga, J. C., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 1995, 709, 163-170.
- [56] Stellwagen, N. C., Bossi, A., Gelfi, C., Righetti, P. G., *Anal. Biochem.* 2000, 287, 167-175.
- [57] Fischer, B. E., Haring, U. K., Tribolet, R., Sigel, H., *Eur. J. Biochem.* 1979, 94, 523-530.
- [58] Stellwagen, N. C., Gelfi, C., Righetti, P. G., *Biopol.* 1997, 42, 687-703.
- [59] Connors, K. A., *Binding constants. The measurements of molecular complex stability.*, John Wiley & Sons, New York 1987.

# **Chapitre IV**

**Etude de l'interaction aptamère –  
lysozyme par analyse frontale  
électrocinétique continue en  
microsystème (FACMCE) avec détection  
de fluorescence**

## Introduction

Après avoir caractérisé le lysozyme (cf. Chapitre II) et l'aptamère anti-lysozyme (cf. Chapitre III), nous nous sommes intéressés à l'interaction entre ces deux partenaires. Le système choisi présentant un certain nombre de difficultés (nécessité de travailler en capillaire modifié afin de limiter l'adsorption du lysozyme, constante de dissociation faible par rapport à la sensibilité de la détection UV), nous avons dans un premier temps étudié un système déjà bien décrit dans la littérature, le couple aptamère – thrombine. La détermination de la constante d'interaction de ce couple par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) avec détection UV est décrite en Annexe 3. L'Annexe 4 est consacrée à la détermination des paramètres de l'interaction aptamère – lysozyme par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) et par analyse frontale électrocinétique continue (FACCE) en capillaire modifié HPC. Compte tenu de la faible valeur de la constante de dissociation associée à ce couple, nous serons confrontés au manque de sensibilité de la détection par absorbance UV.

Afin de pallier ce problème, une méthode d'analyse frontale électrocinétique en microsystème (*frontal analysis continuous microchip electrophoresis*, FACMCE) avec détection de fluorescence sera développée dans ce chapitre. Les paramètres de l'interaction seront déterminés dans un premier article, puis l'influence de différentes conditions expérimentales (nature de l'électrolyte de séparation, force ionique, présence d'un cation divalent) sur l'affinité sera présentée dans un deuxième article. L'interaction ayant lieu entre deux partenaires de charges opposées, la spécificité sera également discutée.

# 1. Contexte de l'étude

Les aptamères sont de courtes séquences oligonucléotidiques (ARN ou ADN simple brin) présentant une affinité spécifique pour des cibles variées, allant des petites molécules aux protéines, voire aux cellules entières [1-3]. Ces molécules synthétiques sont isolées à partir de banques aléatoires par sélection *in vitro* grâce à une technique d'évolution moléculaire baptisée SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) [4-6]. Tout comme les anticorps, les aptamères permettent la reconnaissance moléculaire d'une cible donnée, et offrent en outre un certain nombre d'avantages : faible coût, petite taille, simplicité de la synthèse et du marquage, affinité élevée et meilleure stabilité thermique, tolérance à de larges gammes de pH et de concentration saline. Les aptamères sont ainsi largement employés comme agents sensibles de diagnostic, comme outils pour la recherche biomédicale voire comme agents thérapeutiques [7-9]. Les aptamères ont également démontré leur capacité à remplacer les anticorps ou les récepteurs biomimétiques pour le développement de biocapteurs acoustiques ou optiques [10-12] et comme sonde d'affinité dans le cadre de méthodes séparatives [13-15].

Parallèlement, l'étude des interactions moléculaires ou biomoléculaires non covalentes présente un intérêt élevé pour l'élucidation des processus biologiques, tant dans le domaine thérapeutique et du diagnostic que pour le développement de méthodes bioanalytiques sélectives et sensibles. Dans ce contexte et dans le but d'accroître le développement et l'usage d'aptamères dans une grande variété de domaines, il est nécessaire de développer des méthodes permettant une détermination simple, rapide et précise des paramètres d'interaction aptamère-cible (constante de dissociation et stoechiométrie). Les méthodes disponibles pour l'étude des interactions biomoléculaires incluent la spectroscopie, la chromatographie d'exclusion, la microdialyse, la calorimétrie isotherme, la résonance plasmonique de surface et les techniques séparatives telles que l'électrophorèse sur gel ou l'électrophorèse capillaire (CE) [16-18]. Parmi ces méthodes, la CE offre des avantages puissants tels que précision, faible consommation de réactifs et possibilité de travailler en milieu libre, ce qui rend cette technique séparative particulièrement attractive et bien adaptée à l'analyse de complexes non covalents tels que ceux formés par interaction de l'aptamère avec sa cible. Les méthodes permettant la détermination de constantes par CE sont l'injection directe (DI), l'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) [19, 20], l'analyse frontale (FA) [16, 21], les

techniques de remplissage partiel [22], l'électrophorèse capillaire de pic de vacance (VACE) [23] et la méthode Hummel-Dreyer (HD) [24].

La méthode la plus couramment utilisée pour estimer les constantes d'affinité, l'ACE, est basée sur la variation de la mobilité électrophorétique du substrat observée lors de l'injection de ce dernier dans des électrolytes de séparation contenant une concentration croissante de ligand [25]. La constante d'interaction peut alors être déterminée par le biais de méthodes de linéarisation mathématiques ou par ajustement non linéaire des données expérimentales [26]. Cependant cette méthode n'est valide que pour les systèmes possédant une cinétique rapide, car elle nécessite l'existence d'un équilibre dynamique au sein du capillaire. L'analyse frontale électrocinétique (FACE) consiste à injecter une large zone d'un mélange substrat/ligand pré-équilibré [16], ce qui permet d'étudier tout type de système (rapide ou lent) puisque l'équilibre est maintenu pendant l'analyse. Lors de l'application de la tension, le ligand, le substrat et le complexe migrent à leurs vitesses respectives, conduisant à la formation de différents fronts de migration (sous réserve que les espèces aient des mobilités électrophorétiques distinctes) prolongés par un palier dont la hauteur est proportionnelle à la concentration de l'espèce dans le mélange incubé. La constante d'interaction peut donc être déterminée via le tracé d'isothermes d'adsorption. L'analyse frontale électrocinétique continue (FACCE) est une méthode alternative basée sur l'injection électrocinétique continue du mélange incubé pendant la séparation, conduisant à l'obtention de fronts de migration traités de la même façon qu'en FACE [27]. La FACCE présente l'avantage d'être plus simple dans sa mise en œuvre (application de la tension pendant toute la durée de l'analyse avec des flacons d'entrée et de sortie uniques) et de fournir des paliers plus larges ce qui permet une détermination précise de la hauteur.

Depuis une quinzaine d'années, l'électrophorèse sur micropuce (MicroChip Electrophoresis, MCE) est devenue une puissante alternative aux méthodes séparatives conventionnelles. En effet, la MCE présente des avantages encore plus poussés en termes de rapidité, de faible consommation d'échantillon et de réactifs, de haut débit et de potentialités d'intégration. Dans ce contexte, plusieurs auteurs ont mis en évidence l'intérêt de cette méthode pour la caractérisation d'interactions. Parmi ceux-ci, Gong et al. ont étudié l'interaction protéine-ADN par injection directe d'un mélange pré-incubé de thrombine et d'aptamère anti-thrombine modifié par un marqueur fluorescent [28]. Une constante de dissociation ( $K_d$ ) de 43 nM a été déterminée à l'aide du rapport des aires de l'aptamère libre et lié pour différentes compositions du système. Cette valeur est légèrement inférieure aux  $K_d$  précédemment reportés pour ce couple (240 nM [29] et 450 nM [30]). Une méthode de

détermination de constante par MCE basée sur l'analyse frontale a ensuite été développée par le même groupe sur l'exemple de l'IgE et de son aptamère [31]. La constante de dissociation du complexe IgE-aptamère a été déterminée directement à partir du rapport des quantités d'aptamère libre et lié, déterminées par mesure de la hauteur des paliers respectifs. La valeur trouvée est de  $6 \pm 2$  nM, ce qui est cohérent avec celles précédemment reportées (8 nM [30] et 9 nM [32]). Parallèlement, Le Saux et al. ont illustré le développement de la FACCE sur micropuce en quartz avec détection UV, en mesurant des constantes d'inclusion de composés modèles dans des  $\beta$ -cyclodextrines en mode compétitif [33]. Comme attendu, les constantes d'interaction obtenues en CE et en MCE sont en bon accord et cohérentes avec les données disponibles dans la littérature. La MCE en mode FACCE a également été employée pour la caractérisation de l'interaction entre un glycopeptide antibiotique, la teicoplanine (Teic), immobilisé sur des microsphères magnétiques, et des peptides marqués par un fluorophore [34]. Une modification permanente de la puce en PDMS a été effectuée par polymérisation in-situ de polymères hydrophiles modifiés époxy, de façon à éliminer les interactions non spécifiques. Les constantes d'interaction obtenues sont comparables aux valeurs relevées dans la littérature. Bien que ces travaux témoignent de la possibilité de déterminer des constantes d'interaction par MCE, la plupart d'entre eux mettent en œuvre des microsystèmes composés d'au moins deux canaux en croix ou de géométrie plus complexe, ce qui nécessite l'optimisation de la séquence d'application de la tension afin d'introduire l'échantillon et l'électrolyte dans la puce. En outre, aucun de ces travaux n'ont permis de déterminer la stoechiométrie des systèmes étudiés ; au contraire, cette dernière est supposée a priori ou en s'appuyant sur d'autres études afin de calculer la constante de dissociation.

## 2. Article 1 : Mise au point de la méthodologie FACMCE dans le cas du lysozyme et de son aptamère

### 2.1. Introduction

Dans ce travail, nous présentons une méthodologie simple et originale basée sur la MCE en mode FACCE, que nous avons baptisée analyse frontale électrocinétique continue sur micropuce (Frontal Analysis Continuous MicroChip Electrophoresis, FACMCE), pour la détermination de paramètres d'interaction (constante de dissociation ligand-site  $k_d$  et nombre de sites de liaison sur le substrat  $n$ ). La pertinence de cette méthode a été illustrée par un système présentant certaines difficultés : une protéine fortement basique, le lysozyme, et son aptamère modifié par un fluorophore. Le lysozyme, une hydrolase acide capable de détruire la paroi des cellules bactériennes, peut être utilisé comme biomarqueur pour le diagnostic ou le contrôle de l'efficacité du traitement de maladies sanguines telles que la leucémie [35], ou pour la surveillance du rejet de greffe [36]. Le lysozyme est également employé depuis longtemps comme agent antimicrobien naturel pour la conservation des aliments [37] ; il peut par exemple être ajouté dans le vin afin de contrôler la fermentation malolactique [38] et doit de ce fait être quantifié puisqu'il s'agit d'un allergène potentiel. Etant une protéine fortement basique ( $pI = 11,35$ ), le lysozyme est chargé positivement à pH physiologique et peut s'adsorber sur les parois du canal via des interactions hydrophobes et électrostatiques, entraînant une perturbation de l'interaction. De plus, à pH physiologique la mobilité électrophorétique de l'aptamère anti-lysozyme est quasi identique (en valeur absolue) à la mobilité électroosmotique, ce qui conduit à des temps de migration très longs. Afin de limiter l'adsorption de la protéine ou du complexe et d'accélérer la séparation, un revêtement neutre a été réalisé sur la puce en verre selon le protocole décrit précédemment [39]. La FACCE étant mise en œuvre dans une géométrie simple canal, aucune étape d'injection de l'analyte n'est nécessaire puisque l'échantillon est injecté de façon électrocinétique en continu, et le protocole peut être transposé à des microsystèmes de géométries variables. Afin d'étudier plus en profondeur les performances de cette méthode, les expériences ont été conduites selon deux configurations : (1) concentration variable de ligand (aptamère) et concentration fixe de substrat (lysozyme) et (2) concentration variable de substrat et concentration fixe de ligand, le

ligand étant le seul composé détectable en fluorescence. Dans la première configuration, la détermination des paramètres d'interaction est basée sur la concentration en ligand libre, directement accessible via la mesure de la hauteur du plateau. Inversement, dans la seconde configuration, la détermination est basée sur la concentration en substrat libre, accessible indirectement à partir de la concentration en ligand libre. Les paramètres d'interaction entre le lysozyme et son aptamère ( $k_d$  et  $n$ ) ont été déterminés selon des méthodes de linéarisation mathématiques. Les résultats obtenus dans les deux configurations ont été comparés et ont permis de mieux comprendre l'interaction aptamère-lysozyme.

## 2.2. Article

# Determination of Binding Parameters between Lysozyme and its Aptamer by Frontal Analysis Continuous Microchip Electrophoresis (FACMCE)

Marie Girardot<sup>1</sup>, Hong-Yi Li<sup>2,3</sup>, Stéphanie Descroix<sup>2</sup>, Anne Varenne<sup>1\*</sup>

*Analytical Chemistry, submitted*

Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences, UMR CNRS 7195

<sup>1</sup>Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris (Chimie ParisTech), 11 rue Pierre et Marie Curie, F-75231 Paris cedex 05, France

<sup>2</sup>Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielle (ESPCI ParisTech), 10 rue Vauquelin, F-75231 Paris cedex 05, France

<sup>3</sup>Present address: Beijing National Laboratory for Molecular Sciences (BNLMS), Key Laboratory of Bioorganic Chemistry and Molecular Engineering of Ministry of Education; Institute of Analytical Chemistry, College of Chemistry, Peking University, Beijing, 100871, P. R. China

### Keywords:

Aptamer / Interaction parameters / Dissociation constant / Number of binding sites / Frontal analysis / Lysozyme / Basic protein / Microchip electrophoresis / surface treatment / Isotherms

**Abbreviations:** CE (Capillary Electrophoresis) / FACMCE (Frontal Analysis Continuous MicroChip Electrophoresis) / MCE (Microchip Capillary Electrophoresis) / PB (Phosphate Buffer)

## Abstract

An original and simple methodology based on microchip electrophoresis (MCE) in a continuous frontal analysis mode (that we named frontal analysis continuous microchip electrophoresis, FACMCE) was developed for the simultaneous determination of the binding parameters, i.e. the ligand-site dissociation constant ( $k_d$ ) and the number of binding sites on the substrate ( $n$ ). This simultaneous determination was exemplified with the interaction between an aptamer and its target, as this system becomes of great interest for different applications. Lysozyme, a strongly basic protein, was selected as target. A monochannel glass microchip was coated with a neutral polymer, hydroxypropylcellulose (HPC), so as to strongly reduce the electroosmotic flow and minimize adsorption phenomena onto the channel walls. The FACMCE procedure coupled with fluorescence detection consisted in injecting continuously and electrokinetically a mixture of the fluorescently-labelled aptamer and the non-labelled lysozyme. Experimental conditions were optimized so as to be able to precisely determine the concentration of the free fluorescently-labelled aptamer thanks to its corresponding plateau height and consequently to calculate the  $k_d$  and  $n$  of the aptamer-lysozyme interaction according to mathematical linearization methods. Although the data processing was slightly different, the two configurations tested (variable aptamer/ fixed lysozyme concentrations, and variable lysozyme/ fixed aptamer concentrations, respectively) in a 30 mM PB (pH 7.5) led to  $k_d$  values of  $48.4 \pm 8.0$  nM and  $80.0 \pm 5.8$ , respectively, while the number of binding sites  $n$  on lysozyme was found to be  $0.16 \pm 0.03$  and  $0.21 \pm 0.03$ , respectively. The  $k_d$  values were consistent with reported results (31 nM), and the  $n$  values, never determined before, seemed to indicate that the SELEX process for aptamer selection, implying the immobilization of the target on a solid support, has consequences on the nature of the affinity sites for the aptamer/target interaction.

# 1 Introduction

Aptamers are single-stranded DNA or RNA oligonucleotide sequences which show specific binding affinity towards various targets, ranging from small molecules to proteins, and even whole cells [1-3]. These synthetic molecules are isolated from random-sequence pools by *in vitro* selection thanks to a molecular evolution technique named SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) [4-6]. Aptamers are considered as a nucleic acid version of antibodies, with additional advantages such as low cost, small size, ease of synthesis and labelling, high affinity and increased thermal stability, as well as tolerance to wide ranges of pH and salt concentration. Aptamers can thus be widely employed as sensitive diagnosis agents, biomedical research tools and even therapeutics [7-9]. Aptamers have also demonstrated their ability to replace antibodies or bio-mimetic receptors for the development of acoustic or optical biosensors [10-12] and for other separation methods for which aptamers are often used as affinity probes [13-15].

Non covalent interaction studies between molecules and/or biomolecules are of great interest in the elucidation of biological processes, in the field of therapeutics and diagnosis as well as for the development of selective and sensitive bioanalytical methods. In this context to improve the development and use of aptamers in a wide range of domains, it is necessary to develop methods allowing a simple, fast and accurate evaluation of the binding parameters, i.e. dissociation constant and stoichiometry. Methods available for studying biomolecular interactions include spectroscopy, gel filtration chromatography, microdialysis, isothermal calorimetry, surface plasmon resonance and separation techniques such as gel electrophoresis or capillary electrophoresis (CE) [16-18]. Among all these methods, CE offers powerful attributes such as accuracy, low reagent consumption and the possibility to run binding assay in free solution, making this separation technique very attractive and well adapted to the analysis of non-covalent complexes such as aptamer/target ones. Several CE methods are available to determine binding constants, including direct injection (DI) capillary electrophoresis, affinity capillary electrophoresis (ACE) [19, 20], frontal analysis (FA) capillary electrophoresis [16, 21], partial filling techniques [22], vacancy affinity capillary electrophoresis (VACE) [23], and Hummel-Dreyer method (HD) by capillary electrophoresis [24].

The most common CE method used to estimate binding constants, ACE, is based on the shift in the electrophoretic mobility of the substrate occurring when it is injected in

background electrolytes (BGEs) containing an increasing concentration of ligand [25]. The binding constant can then be determined through mathematical linearization methods or non-linear curve-fitting of the mobility shift [26]. Yet this method is only relevant for systems with fast binding kinetics, since it requires a dynamic equilibrium in the capillary. Frontal analysis capillary electrophoresis (FACE) consists in injecting a large plug of a pre-equilibrated ligand/substrate mixture [16], which allows studying either fast or slow systems since the equilibrium is maintained during analysis. When a voltage is applied, ligand, substrate and complex migrate at their individual velocities, leading to the formation of different migration fronts, provided they have different electrophoretic mobilities, whose heights are an exact measurement of the concentration of each species in the incubated mixture. Therefore, the binding constant can be obtained by plotting binding curves. Frontal analysis continuous capillary electrophoresis (FACCE) is an alternative method that involves the continuous electrokinetic injection of the incubated mixture during separation, leading to fronts that are treated in the same way as for FACE [27]. FACCE presents the advantage of being simpler in the instrumental process (voltage application during the whole process with unique inlet and outlet vials) and providing larger fronts for precise height determination.

Since about 15 years, microchip electrophoresis (MCE) has become a powerful alternative to conventional separation methods. Indeed MCE presents further advantages in terms of speed, low sample and reagent consumption, high throughput and integration capabilities. In this context, different papers have evidenced the interest of MCE for binding characterization. Among them, Gong et al. have studied protein-DNA binding by direct injection of a pre-equilibrium mixture, using thrombin and a fluorescent-labelled thrombin-binding aptamer [28]. A dissociation constant ( $K_d$ ) of 43 nM was determined using the peak area ratio of free and bound aptamer for given concentrations of the binding pairs. This value was slightly smaller than previously reported  $K_d$  values (240 nM [29, 30] and 450 nM [30]). Thereafter the same group has developed MCE binding determination based on frontal analysis (FA) using a model of IgE and its aptamer [31]. The binding constant was derived directly from the ratio of the free and bound aptamers in the equilibrium mixture, measured from the heights of the plateaus. The dissociation constant of the IgE-aptamer complex was thus determined as  $6 \pm 2$  nM, which was consistent with the reported results of 8 [30] and 9 nM [32]. In parallel Le Saux et al. exemplified the implementation of continuous frontal analysis in a quartz microchip with UV detection, through measuring inclusion constants of model compounds into  $\beta$ -cyclodextrin by competitive assays [33]. As expected the binding constants obtained in CE or MCE were found to be in good agreement and consistent with

data reported in the literature. MCE in a continuous frontal analysis mode was also carried out to characterize the binding between a glycopeptide antibiotic teicoplanin (Teic) immobilized on magnetic microspheres, to fluorescently-labelled D-Ala-D-Ala terminus peptides [34]. The PDMS microchip was permanently modified through *in-situ* polymerization of epoxy-modified hydrophilic polymers, in order to prevent non-specific interactions. As previously the binding constants obtained were comparable with values reported in the literature. Even if these papers have evidenced the ability of MCE to determine binding constants, most of them used a microdevice with at least a simple-cross or more complicated layout and thus required an optimization of the voltage sequence to drive the sample and electrolyte within the chip. Moreover none of these works allowed to determine the binding stoichiometry of the studied systems; on the contrary, this latter was supposed a priori or from other studies and used to calculate the dissociation constant.

In this work, we report an original and simple methodology based on continuous frontal analysis MCE (that we named frontal analysis continuous microchip electrophoresis, FACMCE) for the determination of the binding parameters, i.e. ligand-site dissociation constant ( $k_d$ ) and number of binding sites on the substrate ( $n$ ). The proof of the methodology was exemplified with a system presenting some difficulties: a strongly basic protein, lysozyme, and its fluorescently-labelled aptamer, that has never been completely characterized. Lysozyme, an acid hydrolase which destructs bacterial cells walls, can be used as biomarker to diagnose or monitor the treatment efficiency of blood diseases such as leukemia [35], or the rejection of organs transplants [36]. Lysozyme has also long been used as a natural antimicrobial agent in food preservation [37]; it can for example be added in wines to control malolactic fermentation [38, 40] and must thus be quantified since it is a potential allergen. Being a strongly basic protein ( $pI = 11.35$ ), lysozyme is positively charged under physiological pH and could strongly adsorb onto the channel wall due to hydrophobic and electrostatic interactions. Thus it seems that the aptamer-lysozyme complex should also adsorb on the channel walls, causing disruption of the interaction. In addition, under physiological pH electrophoretic mobility of the lysozyme-binding aptamer had nearly the same absolute value as the electroosmotic mobility, leading to very long migration times. In order to prevent protein and complex adsorption, and allow for rapid separations, a neutral coating was performed on the glass microchip as previously described [39]. The continuous frontal analysis being performed in a single channel format, it thus avoids any analyte injection step, since the sample is continuously and electrokinetically injected, and can be applied to microchips with variable designs. To deeply investigate the performances of the

methodology, the experiments were performed according to two configurations: with (1) varying ligand (i.e. aptamer) concentrations and fixed substrate (i.e. lysozyme) concentration, and (2) varying substrate concentrations and fixed ligand concentration, the ligand being the unique detectable compound. In the first configuration, the determination of the interaction parameters is based on the free ligand concentration, which is directly accessible. Conversely, in the second configuration, the determination of the interaction parameters is based on the free substrate concentration, that is indirectly accessible through the free ligand concentration. The interaction parameters between lysozyme and its aptamer ( $k_d$  and  $n$ ) were determined according to mathematical linearization methods. The results obtained with both configurations were compared and allowed to better understand the aptamer-lysozyme interaction.

## 2 Theoretical [41]

Let us consider an interaction between a substrate (S) and a ligand (L) that can be described by a 1: n complex (C). In this case, the equilibrium can be written (Eq. 1):



The binding constant ( $K_f=1/K_d$ ) is then defined as follows (Eq. 2):

$$K_f = \frac{[C]}{[S][L]^n} \quad (2)$$

where [C], [S] and [L] are the equilibrium concentrations of the complex, free substrate and free ligand, respectively.

In the continuous frontal analysis mode, an incubated substrate/ligand mixture is continuously introduced into the capillary. It is worth noting that, in most cases, the substrate and the ligand don't play symmetric roles: the partner showing more potential interaction sites (in most of the case, the larger one) is usually considered as the substrate, whereas the other partner, supposed to show a unique binding mode, is considered as the ligand. In this case, n corresponds to the number of binding sites on the substrate. This situation is particularly true for systems of biological interest, such as the interaction between proteins and small molecules. Let us assume that the accessible parameter is the concentration of free ligand, from the height of the plateau following the migration front of the ligand.

If the concentration of the ligand is varied whereas the concentration of the substrate is constant, the binding constant can be obtained from the mass balance equations for the substrate and ligand, yielding the equilibrium complex and free substrate concentrations (Eq. 3 and 4):

$$[C] = [S]_0 - [S] = \frac{[L]_0 - [L]}{n} \quad (3)$$

$$[S] = [S]_0 - [C] = [S]_0 - \frac{[L]_0 - [L]}{n} \quad (4)$$

where  $[L]_0$  and  $[S]_0$  are the initial concentrations of the ligand and substrate in the incubated mixture, respectively.

A deeper study employing the multi-site binding model for the determination of the binding parameters expresses the independent binding of one ligand L to one site s of a given binding strength of a substrate S according to a monomolecular reactional scheme (Eq. 5):



The binding parameters are in this model the number of binding sites  $n$  belonging to each category and the ligand-site interaction constant  $k_f (=1/k_d)$ , defined as follows (Eq. 6):

$$k_f = \frac{[s.L]}{[s][L]} \quad (6)$$

The mass balance equation can be expressed as (Eq. 7):

$$[s]_0 = [s] + [s.L] = n[S]_0 \quad (7)$$

where  $[s]_0$  and  $[s]$  are the initial and free concentrations of the sites.

Data processing can be achieved either by non-linear or linear regressions [42]. In this study, data were treated by performing linearization methods. The binding constant ( $k_f$ ) as well as the number of binding sites ( $n$ ) were simultaneously determined from the equilibrium free ligand concentration  $[L]$  according to three mathematical methods for data linearization proposed for the FACCE mode. The mean number of ligands bound to the substrate,  $r$ , is defined as (Eq. 8):

$$r = \frac{[L]_0 - [L]}{[S]_0} = n \frac{[s.L]}{[s] + [s.L]} = n \frac{k_f [L]}{1 + k_f [L]} \quad (8)$$

and can be directly determined from the free ligand concentration.

Table 1a reports the rearranged equations used in these methods. It is worth noting that although all equations are equivalent in their algebraic form, the impact of the precision of  $[L]$  value depends on whether it appears on numerator or denominator.

If the concentration of the substrate is varied whereas the concentration of the ligand is constant, the mean number of substrate bound to the ligand,  $r_s$ , is defined as (Eq. 9):

$$r_s = \frac{[S]_0 - [S]}{[L]_0} = \frac{[s - L]}{n([L] + [s - L])} = \frac{k_f [S]}{1 + nk_f [S]} \quad (9)$$

The binding parameters can then be determined from the equilibrium free substrate concentration  $[S]$  using linearization methods very similar to the ones described previously (Table 1b). If the equilibrium free substrate concentration is not directly accessible, it has to be derived from the equilibrium free ligand concentration. As the stoichiometry of the complexation is unknown a priori, it first has to be determined through a direct calculation. A value of  $n$  is arbitrarily chosen, and the binding constant is calculated for each composition of the system thanks to the following equation (Eq. 10):

$$k_f = \frac{[L]_0 - [L]}{[L] \times (n[S]_0 - [L]_0 + [L])} \quad (10)$$

The value of  $n$  is then optimized in order to minimize the standard deviation on the  $k_f$  values, and  $[S]$  is calculated using Equation 4. The binding isotherm obtained is linearized according to the three methods, and the dissociation constant  $k_d$  is determined as well as the number of binding sites  $n$ .

**Table 1: binding isotherm and its linearized forms for the determination of binding constants ( $k_f$ ) and stoichiometry ( $n$ ) using the continuous FA mode**

	Method name	Equation	$k_f$ determination	$n$ determination
(a) Variable ligand, constant substrate	Binding isotherm	$r = f([L])$	<i>Slope of the tangent at the origin</i>	<i>Ordinate of the horizontal asymptote</i>
	x-reciprocal (Scatchard plot)	$\frac{r}{[L]} = nk_f - rk_f$	<i>- Slope</i>	<i>- Intercept/slope</i>
	y-reciprocal	$\frac{[L]}{r} = \frac{1}{nk_f} + \frac{[L]}{n}$	<i>Slope/intercept</i>	<i>1/slope</i>
	Double-reciprocal	$\frac{1}{r} = \frac{1}{nk_f[L]} + \frac{1}{n}$	<i>Intercept/slope</i>	<i>1/intercept</i>
(b) Variable substrate, constant ligand	Binding isotherm	$r_s = f([S])$	<i>Slope of the tangent at the origin</i>	<i>1/Ordinate of the horizontal asymptote</i>
	x-reciprocal (Scatchard plot)	$\frac{r_s}{[S]} = k_f - nk_f r_s$	<i>Intercept</i>	<i>-Slope/intercept</i>
	y-reciprocal	$\frac{[S]}{r_s} = \frac{1}{k_f} + n[S]$	<i>1/intercept</i>	<i>Slope</i>
	Double-reciprocal	$\frac{1}{r_s} = \frac{1}{k_f[S]} + n$	<i>1/Slope</i>	<i>Intercept</i>

## 3 Materials and methods

### 3.1 Chemicals and reagents

The 30-mer lysozyme-binding aptamer (5'-FAM/ATC AGG GCT AAA GAG TGC AGA GTT ACT TAG-3') was synthesized, labelled with fluorescein phosphoramidite (FAM) at the 5'-end and HPLC-purified by Eurogentec France (Angers, France) and stored at -18 °C as a 100 µM stock solution in water. Lysozyme from chicken egg white (Mr 14 307, purity 95%), cytochrome c from horse heart (type VI), sodium monobasic phosphate and sodium dibasic phosphate were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Hydroxypropylcellulose (Mr 100,000) was purchased from Scientific Polymer Products (Dean PKWY, Ontario, USA). Standard 1 M NaOH solution Normadoses were provided by VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

All samples, solutions and buffers were prepared using analytical-grade chemicals and ultra-pure water produced by a Direct-Q3 system (Millipore, Molsheim, France).

### 3.2 MCE instrumentation

Monochannel glass microchips were purchased from Micronit Microfluidics (Enschede, The Netherlands). The separation channel was 7.3 cm in length, 20 µm in depth and 50 µm in width. Upchurch reservoirs from Oak (Harbor, USA) were bonded around the wells to increase the reservoir volume. Microchip analysis was monitored by an IX-71 inverted fluorescence microscopic system (Olympus, France) equipped with a spectral filter 460-490 nm and a 100 W mercury lamp. A XCD-X710 camera (Sony, New-York City, USA) was mounted on the microscope and a NI Vision software (Alliance Vision, France) was used for camera control and image processing. A HVS448 high-voltage power supply (Labsmith, Livermore, USA) was used to apply electric fields to the microchannel through platinum electrodes placed in the reservoirs. All system operations were performed with Labview 7.1 (National Instrument, Austin, USA) programmed through a PC-based computer. All experiments were performed at room temperature.

### 3.3 Procedures

#### 3.3.1 Microchannel coating procedure

The HPC coating procedure was achieved according to the one previously developed by Poitevin et al. [39]. A 5% (w/v) HPC aqueous solution was prepared. The separation

channel was activated by 1 M NaOH and flushed with ultrapure water. Then the channel was filled with the HPC solution from one end of the channel and flushed by air. The two wells were washed with ultra-pure water (Milli-Q) and then liquid in wells was removed. The chip was heated in a GC oven from 60°C to 140°C at 5°C/min, and maintained at 140°C for 30 minutes. After heating, the channel was washed with ultra-pure water. The electroosmotic mobility was estimated according to the procedure developed by Shakalisava et al. [43], which consists in measuring the apparent electrophoretic mobility of 0.01 mg.mL<sup>-1</sup> fluorescein in a 9 mM sodium borate buffer pH 9.2 knowing its electrophoretic mobility in these conditions ( $-38.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

### 3. 3. 2 *FACMCE experiments*

Before use, the fluorescently-labelled aptamer was activated by heating at 95°C for 5 min in a water bath and then cooled down to room temperature by itself. After rinsing 3 times with ultrapure water, then with the 30 mM sodium phosphate buffer (PB) (pH 7.5), the separation channel was filled with the separation buffer. One well was filled with the buffer while the other well was filled with the sample, i.e. the aptamer alone or an incubated mixture of aptamer and protein (incubation for about 20 min), respectively. The detector was placed in the middle of the channel (effective length, 3.65 cm). A negative voltage of 2200 V (electric field, 300 V/cm) was applied, the cathode being placed in the sample well, so as to achieve a continuous electrokinetic injection of the sample. Meanwhile, fluorescence signal was recorded.

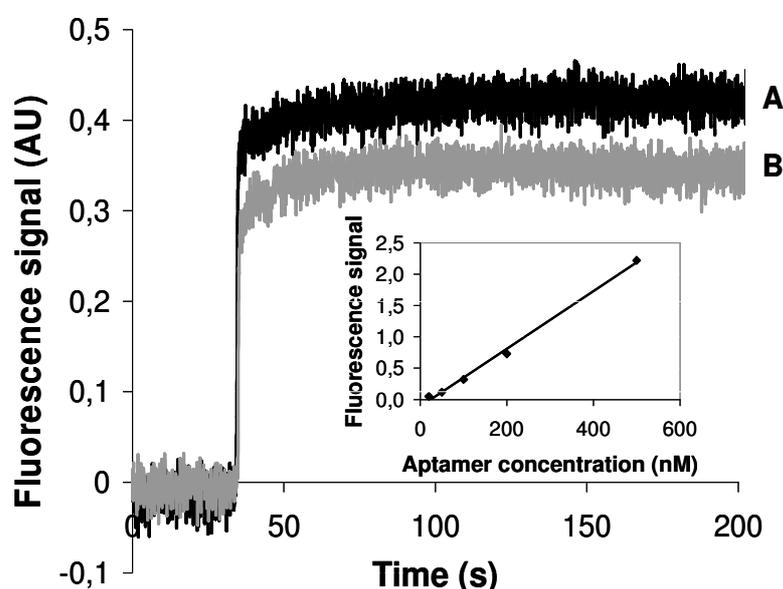
## 4 Results and discussion

Aptamer-protein interactions usually show very small dissociation constants ( $10^{-9}$  -  $10^{-11}$  M) [44]. It is thus necessary to analyse the equilibrium at a low concentration range comparable to the dissociation constant in order to determine the binding parameters [19], thus requiring an adequate detection sensitivity. To our knowledge no microchip format was employed since now for aptamer/target full characterization, i.e. in terms of ligand-site dissociation constant ( $k_d$ ) and number of binding sites on the substrate ( $n$ ) determination. To demonstrate the feasibility of such a characterization in a microchip, lysozyme was selected as a target since its quantification shows a great interest in the clinical [35, 36] and food industry [37, 38] fields. For this aptamer/lysozyme system, a dissociation constant of 31 nM was reported by Ellington et al., by employing standard absorbance assays to measure the inhibition of the lysozyme's cytolytic activity by the aptamer [45]. In a preliminary work, a series of experiments was run in FACCE mode with UV detection (results not shown), but the low sensitivity of the UV detector (LOD:  $10^{-5}$  M aptamer) did not allow studying the specific interaction between lysozyme and its aptamer. Only a weaker interaction with a dissociation constant comparable to the aptamer concentration range ( $10^{-6}$  M  $< K_d < 10^{-5}$  M) was observed, and attributed to non-specific binding through electrostatic interactions, the partners being of opposite charge. In order to overcome the inadequate sensitivity of UV detection, it appeared necessary to employ a fluorescently-labelled aptamer in a separation system providing fluorescence detection.

In this work, a new methodology, FACMCE, coupled with fluorescence detection was developed and therefore used to determine the interaction parameters of the lysozyme-aptamer pair. FACMCE consists in continuously and electrokinetically injecting an incubated mixture of lysozyme and aptamer at different concentrations, leading to fronts. The aptamer was labelled with fluorescein at the 5'-end of the oligonucleotidic sequence, whereas the protein was label-free. The lysozyme being a very basic protein ( $pI > 11$ ), adsorption was reduced by coating the surface of the channel with a neutral polymer, hydroxypropylcellulose (HPC), according to the procedure developed by Poitevin et al. [39]. The strong reduction of the electroosmotic mobility ( $\mu_{eo} < 3 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup> V<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> in 9 mM sodium borate buffer (pH 9.2)) and the repeatability of the migration times (RSD  $< 3\%$ ) reflected the quality and the stability of the channel modification.

#### 4.1 Electrophoretic profiles by FACMCE

The limit of detection and the linear range for the labelled aptamer quantitation was studied by electrokinetically and continuously injecting various concentrations of the aptamer (0 – 1  $\mu\text{M}$ ) in a 30 mM sodium phosphate buffer (PB) (pH 7.5). In these pH conditions, as the aptamer was negatively charged due to the deprotonation of the phosphate groups, and EOF value was close to zero, a negative voltage was applied. A front followed by a horizontal plateau was observed at around 30 s, corresponding to an electrophoretic mobility of around  $-40 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  which was consistent with previous results obtained for the aptamer in conventional CZE (Figure 1). The limit of detection (LOD) for aptamer in PB was determined as 10 nM ( $S/N=2$ ). The linear range was 20-500 nM ( $R^2=0.996$ ) (see insert in Figure 1).



**Figure 1:** electropherograms obtained during FACMCE analysis of 80 nM aptamer (A) and 80 nM aptamer mixed with 100 nM lysozyme (B). Insert: calibration curve of the fluorescently-labelled aptamer in 30 mM phosphate buffer (pH 7.5) using the optimized experimental conditions. The LOD was 10 nM ( $S/N = 2$ ) and the linear range was 20 – 500 nM. Equation of the least-squares regression straight line ( $n = 5$ ):  $y = 0.0046x - 0.1118$ ,  $R^2 = 0.9960$ .

Experimental conditions: 50  $\mu\text{m}$  x 20  $\mu\text{m}$  x 7.3 cm HPC-coated glass microchip (detection length, 3.65 cm). Background electrolyte: 30 mM sodium phosphate (pH 7.5). Applied voltage: -2.2 kV. Temperature: 25°C. Continuous electrokinetic injection. Sample: lysozyme-binding aptamer at various concentrations.

For interaction study, a mixture of the labelled aptamer with lysozyme was studied by FACMCE in 30 mM PB (pH 7.5). The optimal incubation time was set to 20 min. In these pH conditions, the aptamer was negatively charged, as indicated previously, whereas lysozyme was positively charged due to its high isoelectric point ( $pI = 11.35$ ). Thus under a negative voltage, the free aptamer could migrate into the channel and be detected as the first front according to the electrophoretic mobility determined at the apex of the front derivative (Figure 1). No obvious second plateau could be observed even with a 10 min analysis, which

means that the aptamer-lysozyme complex was either (i) positively charged and consequently did not migrate into the channel or (ii) negatively charged but with an electrophoretic mobility lower than  $-5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  so that it could not be detected during the 10 min-analysis time, or (iii) not be observed due to adsorption on the channel surface (which was however not experimentally observed). A low electrophoretic mobility seems probable; indeed, as lysozyme has positive charges and aptamer negative charges, the net charge of a possible lysozyme/aptamer complex should thus be lower (either positively or negatively), whereas the mass increases greatly.

The aptamer front height allowed the free aptamer concentration determination thanks to the previously established calibration curve (see insert in Figure 1), and further determination of the binding parameters.

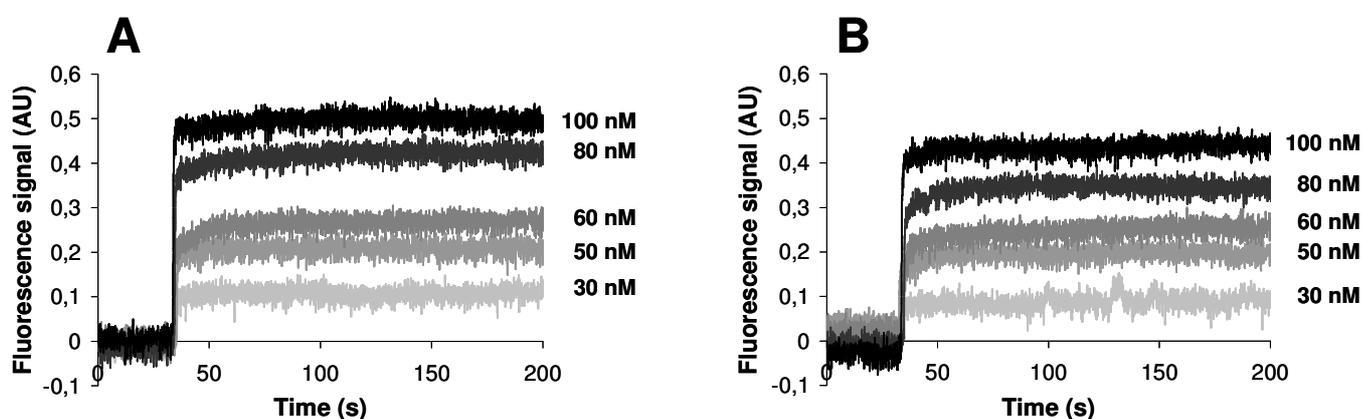
## 4.2 Interaction parameters determination

Two situations were investigated for the interaction study between lysozyme and its aptamer: (1) incubation of the aptamer in varying concentrations with lysozyme at a fixed concentration and (2) incubation of the aptamer at a fixed concentration with lysozyme in varying concentrations. Given the huge difference in size between the two partners, aptamer was considered as the ligand and lysozyme as the substrate. In the first configuration, the determination of the interaction parameters was based on the free ligand concentration, which was directly accessible. Conversely, in the second configuration, the determination of the interaction parameters was based on the free substrate concentration, so that the lysozyme should be labelled in order to be detected. Yet in order to accurately compare the two configurations, we used the same partners (non-labelled lysozyme and fluorescently-labelled aptamer), in the same range of concentration ratios: thus the concentration of free lysozyme had to be indirectly calculated from the concentration of free aptamer. The binding isotherm and three linearization models (x-reciprocal method, y-reciprocal method and double-reciprocal method) were used to calculate the dissociation constant value between lysozyme and its aptamer (Table 1).

### 4.2.1 Incubation of the aptamer in varying concentrations and the lysozyme at a fixed concentration

Aptamer (30 to 100 nM) was incubated with 100 nM lysozyme. In order to achieve accurate comparison, samples containing the aptamer with or without lysozyme were

analyzed in parallel for each aptamer concentration. As expected, the plateau height for free aptamer obviously decreased when increasing the lysozyme concentration (Figure 1). Based on comparing the plateau height of free aptamer without (Figure 2A) and with lysozyme (Figure 2B), the interaction parameters were determined according to the methods previously described (Table 1).



**Figure 2:** electropherograms obtained during FACMCE analysis of 30, 50, 60, 80 and 100 nM aptamer alone (A) or mixed with 100 nM lysozyme (B). Experimental conditions: see Fig. 1.

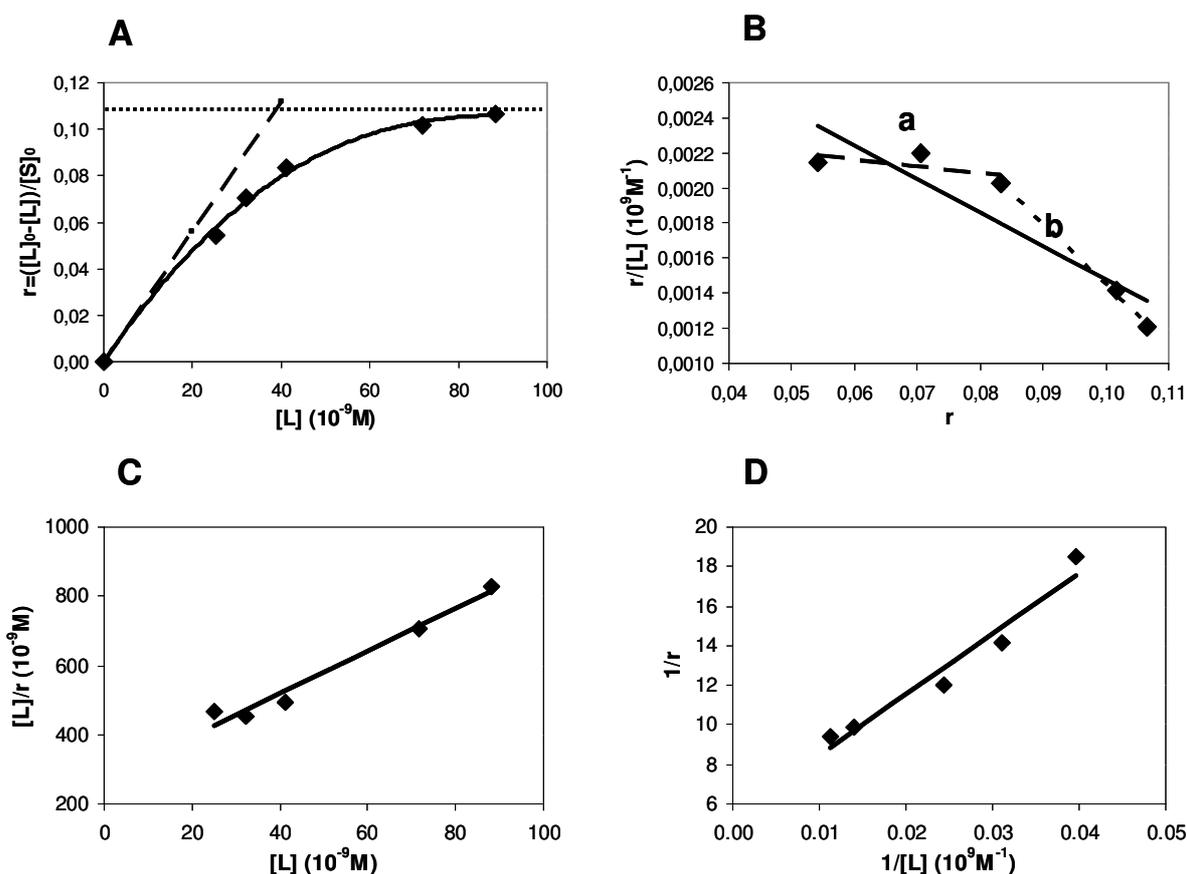
The results are presented in Figure 3 and Table 2a, indicating a mean number of binding sites  $n$  on lysozyme of  $0.16 \pm 0.03$  and an average ligand-site dissociation constant ( $k_d$ ) of  $48.4 \text{ nM} \pm 8.0 \text{ nM}$ .

**Table 2:** binding parameters of the aptamer-lysozyme complex as determined by the FACME method using the binding isotherm and three linearization plotting methods. Sample: (a) aptamer in varying concentrations (30-100 nM) mixed with 100 nM lysozyme or (b) 100 nM aptamer mixed with varying concentrations of lysozyme (100-225 nM).

Method	(a) Variable aptamer		(b) Variable lysozyme	
	$k_d$ (nM)	$n$	$k_d$ (nM)	$n$
isotherm	39.4	0.11	76.2	0.16
x-rec	52.6	0.18	87.7	0.23
y-rec	44.6	0.16	81.2	0.22
double-rec	57.2	0.19	75.1	0.22
<b>Average</b>	<b><math>48.4 \pm 8.0</math></b>	<b><math>0.16 \pm 0.03</math></b>	<b><math>80.0 \pm 5.8</math></b>	<b><math>0.21 \pm 0.03</math></b>

This latter result is in good accordance with the value of dissociation constant reported by Ellington et al. (31 nM) [45]. Concerning the  $n$  value, no reference value is available in the literature. A first hypothesis for this low value could be explained by the interaction of one aptamer with 6 proteins, which does not seem reasonable from a steric point of view. A second hypothesis could be the existence of non-specific interactions. However, the specificity of the interaction was checked by replacing lysozyme by cytochrome c, another

strongly basic protein (pKa ~ 10). No significant variation in the plateau height of the aptamer was observed when cytochrome c was added to the sample, showing the absence of non-specific interactions between aptamer and lysozyme in this concentration range. A third hypothesis could be an aggregation phenomenon during complexation. However, no evidence of aggregates in the capillary or in the sample vial was observed. A fourth hypothesis could be that only 16% of the active sites on the population of lysozyme could interact with this aptamer. This latter hypothesis could be related to the SELEX process employed for this aptamer selection, which implied immobilizing the target on a solid support via a biotin-streptavidin bond [45] and could induce a particular conformation, so that only the sequences showing affinity towards a given protein conformation would be selected. Another hypothesis could be related to the fact that the free state of an aptamer exists not in a single conformation, but rather in a dynamic equilibrium of inactive states that rapidly could be converted to active species [46].



**Figure 3: binding isotherm (A) and its linearization forms according to the x-reciprocal (B), y-reciprocal (C) and double-reciprocal (D) methods from experimental data of Fig. 2.** Experimental conditions: see Fig. 1, except sample: aptamer in varying concentrations (30-100 nM) mixed with 100 nM lysozyme. Equation of the non-linear regression of the binding isotherm (A):  $y = 6 \times 10^{-8} x^3 - 2 \times 10^{-5} x^2 + 0.0028x$ ,  $R^2 = 0.9969$ . Equations of the least-squares regression straight lines ( $n = 5$ ): (B)  $y = -0.0190x + 0.0034$ ,  $R^2 = 0.8293$ ; (C)  $y = 6.1263x + 273.2000$ ,  $R^2 = 0.9743$ ; (D)  $y = 307.4000x + 5.3766$ ,  $R^2 = 0.9559$ .

Interestingly enough, the linearization curve resulting from the x-reciprocal method, usually referred as “Scatchard plot”, did not present a good linearity ( $R^2 = 0.8393$ ), which is often the case when the substrate shows more than one binding domain [41]. The curve was then segmented into two linear parts (Figure 3B): (i) a linear part corresponding to aptamer concentration in the 30-50 nM range ( $x < 0.5$ , with  $x = [L]_0/[S]_0$  the initial aptamer/protein ratio) and (ii) a linear part corresponding to aptamer concentration in the 50-100 nM range ( $0.5 < x < 1$ ). The binding parameters were determined for each part of the curve, and the same process was achieved for the other two linearization forms. The results (Table 3a) suggested the existence, among the population of sites on one protein, of two types of affinity sites, with an average of around 10% for the low affinity sites ( $k_d = 255.4$  nM,  $n = 0.61$ ) active at low aptamer concentration (30-50 nM,  $x < 0.5$ ), and around 90% for the high affinity sites ( $k_d = 28.8$  nM,  $n = 0.14$ ) active at higher aptamer concentration (50-100 nM,  $0.5 < x < 1$ ). These observations seem to indicate a cooperative system [47].

**Table 3: binding parameters of the aptamer-lysozyme complex after segmentation into two binding domains.** Sample: (a) aptamer in varying concentrations (30-100 nM) mixed with 100 nM lysozyme or (b) 100 nM aptamer mixed with varying concentrations of lysozyme (100-225 nM).

	Concentration range	Aptamer/protein ratio (x)	$k_d$ (nM)	n	%
(a) Variable aptamer	30-50 nM	0.3-0.5	$255.4 \pm 40.5$	$0.61 \pm 0.09$	10
	50-100 nM	0.5-1.0	$28.8 \pm 0.3$	$0.14 \pm 0.00$	90
(b) Variable lysozyme	150-225 nM	0.4-0.7	$140.0 \pm 29.4$	$0.28 \pm 0.03$	40
	100-150 nM	0.7-1	$42.4 \pm 0.1$	$0.18 \pm 0.00$	60

#### **4.2.2 Incubation of the aptamer at a fixed concentration and the lysozyme in varying concentrations**

100 nM aptamer was incubated with lysozyme (100 to 225 nM). As previously, a negative voltage was applied so that the dissociation constant calculation was based on the plateau height of free aptamer. As described in the theoretical part, the data were processed differently than in the previous configuration, since there was no direct access to the free protein concentration. First, n was set to 0.16, according to the value determined in the first configuration. Then the dissociation constant ( $k_d$ ) was calculated for each lysozyme concentration using Equation 10, and n was optimized so as to provide the lowest standard deviation on the  $k_d$  values. The binding parameters obtained through this optimization allowed the free protein concentration [S] to be calculated (Equation 4) and the data obtained were linearized (Table 2b). The binding parameters were then derived according to the three

methods (results not shown). The value of  $n$  found was  $0.21 \pm 0.03$  while the average dissociation constant ( $k_d$ ) was  $80.0 \text{ nM} \pm 5.8 \text{ nM}$  (Table 2b). These results were of the same order of magnitude as those obtained in the reversed configuration (i.e., aptamer in varying concentrations mixed with 100 nM lysozyme, Table 2a): the number of binding sites is quite identical, whereas the slight difference in dissociation constant could be explained by the inaccuracy brought by the indirect determination of the concentration of free substrate in this case.

Similarly, the Scatchard plot could be segmented into two linear parts: (i) a linear part corresponding to lysozyme concentration in the 100-150 nM range (equation of the least-squares regression straight line ( $n = 2$ ):  $y = -0.0236x + 0.0042$ ) and (ii) a linear part corresponding to lysozyme concentration in the 150-225 nM range (equation of the least-squares regression straight line ( $n = 3$ ):  $y = -0.0058x + 0.0018$  ( $R^2 = 0.5945$ )). As expected,  $R^2$  values are lower than those obtained in the opposite configuration (fixed substrate concentration), which confirms that indirect quantitation of the varying compound leads to less precise results. These regions seem to correspond to two distinct binding domains on one protein: (i) around 60% of high affinity sites ( $k_d = 42.4 \pm 0.1$ ,  $n = 0.18 \pm 0.00$ ) in the 100-150 nM lysozyme range ( $0.7 < x < 1$ ) and (ii) around 40% of lower affinity sites ( $k_d = 140.0 \pm 29.4$ ,  $n = 0.28 \pm 0.03$ ) in the 150-225 nM lysozyme range ( $0.4 < x < 0.7$ ) (Table 3b). The system seems again to be described as a cooperative one, since the affinity increased with the aptamer/protein ratio. These results are quite similar to those obtained previously. As the  $x$  ranges are a little bit different in the two configurations, this could explain the difference in the percentage of low and high affinity sites. However, the first configuration (fixed lysozyme concentration and variable aptamer concentration) is more convenient and accurate, since the binding parameters are accessible straightforwardly. Thus it will be chosen for the characterization of binding parameters for further studies.

## 5 Concluding remarks

In this work, a new methodology employing frontal analysis in a continuous format in a microsystem (FACMCE) was developed to allow the simultaneous determination of the binding constant and stoichiometry of an interacting system, in a quick and easy format. It was exemplified with the interaction between a lysozyme-binding aptamer and its target. In order to overcome the difficulties raised by the strong basicity of the protein, the separation channel was permanently coated with a neutral polymer, hydroxypropylcellulose (HPC), which also allowed to strongly reduce the electroosmotic mobility. After optimization of the running conditions, the binding parameters were derived from the free labelled-aptamer plateau height, using three mathematical linearization methods. The results obtained showed that the binding between lysozyme and its aptamer presents two sites of different binding affinities. A low aptamer/protein ratio favoured weak sites, whereas a higher aptamer/protein ratio induced a stronger, more specific affinity. The two configurations tested (variable aptamer/ fixed lysozyme and variable lysozyme/ fixed aptamer) led to similar results, although the data processing was slightly different. The configuration where aptamer (i.e. the compound which is directly detected) is varied and lysozyme is constant allowed an easier and more direct access to the binding parameters, and could thus be chosen for further experiments. Thus the capability of FACME for a fast and complete characterization of any type of aptamer-protein interactions was demonstrated. This method is currently used to further investigate the influence of various parameters on the aptamer-target interaction.

## 2.3. Conclusion

Dans ce travail, une nouvelle méthodologie basée sur l'analyse frontale électrocinétique continue en microsysteme (FACMCE) a été développée pour la détermination simultanée, rapide et simple de la constante d'interaction et de la stoechiométrie d'un système. Ceci a été illustré par l'interaction entre un aptamère dirigé contre le lysozyme et sa cible. Afin de surmonter les difficultés engendrées par la forte basicité du lysozyme, le canal de séparation a été modifié de façon permanente par un polymère neutre, l'hydroxypropylcellulose (HPC), ce qui a également permis de réduire fortement le flux électroosmotique. Après optimisation des conditions de travail, les paramètres d'interaction ont été déterminés à partir de la hauteur du plateau de l'aptamère libre, à l'aide de trois méthodes de linéarisation mathématique. Les résultats obtenus ont montré que l'interaction entre le lysozyme et son aptamère mettait en jeu deux sites d'affinité différente. Un faible rapport de concentration aptamère/protéine favorise les sites faibles, tandis qu'un rapport plus élevé induit une interaction plus intense et spécifique. Les deux configurations testées (aptamère variable / lysozyme constant et lysozyme variable / aptamère constant) ont conduit à des résultats similaires, bien que le traitement des données diffère légèrement. La configuration pour laquelle l'aptamère (composé directement détectable) est en concentration variable et le lysozyme à une concentration fixe permet un accès plus facile et direct aux paramètres de l'interaction, et sera ainsi préférentiellement employée dans le cadre d'expériences ultérieures. L'intérêt de la FACMCE pour la caractérisation de tous types d'interactions aptamère-protéine a ainsi été démontré. Cette méthode a également été employée afin d'étudier plus précisément l'influence des différents paramètres opératoires sur l'interaction aptamère-cible.

## **3. Article 2 : Influence des conditions de milieu et de préparation de l'échantillon sur les paramètres d'interaction du système lysozyme/aptamère**

### ***3.1. Introduction***

Dans l'article précédent, nous avons développé une méthodologie simple et originale, baptisée analyse frontale électrocinétique continue en microsysteme (FACMCE), permettant la détermination simultanée des paramètres d'interaction ( $k_d$  et  $n$ ) [48], à travers l'étude d'un système complexe : le lysozyme, protéine fortement basique, et son aptamère marqué par un fluorophore.

L'interaction entre un aptamère et sa cible dépend fortement de la conformation de la molécule d'aptamère, et peut être influencée par la nature de la phase liquide, en particulier par divers cations [14, 49-53]. Au cours de travaux antérieurs (cf. Chapitre III), nous nous sommes intéressés aux interactions entre des cations monovalents et divalents et l'aptamère anti-lysozyme employé dans cette étude, par électrophorèse capillaire d'affinité, dans des électrolytes de différente nature (tampon phosphate ou MOPS) et force ionique [54]. Après correction des effets de force ionique et de condensation de contre-ions, nous avons montré que la mobilité de l'aptamère dépendait également d'autres phénomènes, tels la formation de complexes binaires ou ternaires avec les co-ions de l'électrolyte ou un éventuel changement de conformation en présence de dications. Nous avons ainsi mis en évidence l'impact de la nature de l'électrolyte sur le comportement électrophorétique, et probablement la conformation de l'aptamère.

Afin d'approfondir cette étude, nous avons employé la méthodologie FACMCE afin de mettre en lumière l'influence de diverses conditions expérimentales sur les paramètres de l'interaction en le lysozyme et son aptamère. Afin de limiter l'adsorption de la protéine et du complexe et d'accélérer les séparations, la puce en verre a été modifiée de façon permanente par un polymère neutre, l'hydroxypropylcellulose (HPC), comme décrit précédemment [39]. Plusieurs paramètres ont été étudiés, tels que la nature et la force ionique de l'électrolyte de séparation, la nature et la concentration du cation divalent et la réalisation d'un traitement thermique préalable de l'aptamère.

### **3.2. Article**

## **Binding parameters between lysozyme and its aptamer by frontal analysis continuous microchip electrophoresis (FACMCE): a comprehensive study of buffer composition, divalent cation concentration and thermal treatment effects on the affinity**

**Keywords:** aptamer / interaction parameters /dissociation constant / number of binding sites / frontal analysis / lysozyme / basic protein/ microchip electrophoresis / channel modification / isotherms

**Abbreviations:** FACMCE (Frontal Analysis Continuous MicroChip Electrophoresis)

## Abstract

An original and simple methodology based on microchip electrophoresis (MCE) in a continuous frontal analysis mode (frontal analysis continuous microchip electrophoresis, FACMCE) has been previously developed for the simultaneous determination of the binding parameters, i.e. the ligand-site dissociation constant ( $k_d$ ) and the number of binding sites on the substrate ( $n$ ). FACMCE was employed here to provide new insights into the influence of various experimental conditions on possible conformation change of the aptamer, the binding parameters and thus on the binding parameters between a lysozyme-binding aptamer and its target. In order to overcome the difficulties raised by the strong basicity of the protein, the separation channel was permanently coated with a neutral polymer, the hydroxypropylcellulose (HPC), which allowed a strong reduction of the electroosmotic mobility. Several parameters were studied: nature and ionic strength of the separation buffer, nature and concentration of a divalent cation, and the use of a thermal treatment of the sample. Increasing ionic strength led to a decrease in the dissociation constant, which seems to indicate that the binding between lysozyme and its aptamer is mainly due to non-ionic interactions, as well as a decrease of the number of binding sites, which reflects a change of binding mode and/or an amplification of selectivity. The addition of a divalent cation to the buffer improved the binding affinity of the aptamer, via an increase in ionic strength coupled to another phenomenon which could be a conformational change. The nature of the buffer and of the dication added also had an influence on the binding parameters of the aptamer-lysozyme interaction. Finally, it was observed that heating the aptamer solution before use helped to stabilize the optimal conformation, leading to an improved binding affinity as well as a smaller standard deviation on the binding parameters values. This study thus allowed to evidence some phenomena involved in such an interaction.

# 1 Introduction

Aptamers are single-stranded DNA or RNA oligonucleotide sequences which show specific binding affinity toward various targets, ranging from small molecules to proteins, and even whole cells [1-3]. These synthetic molecules are isolated from random-sequence pools by *in vitro* selection thanks to a molecular evolution technique named SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) [4-6]. Aptamers are considered as a nucleic acid version of antibodies, with additional advantages such as low cost, small size, ease of synthesis and labelling, high affinity and increased thermal stability, as well as tolerance to wide ranges of pH and salt concentration. Aptamers can thus be widely employed as sensitive diagnosis agents, biomedical research tools and even therapeutics [7-9]. Aptamers have also demonstrated their ability to replace antibodies or bio-mimetic receptors for the development of acoustic or optical biosensors [10-12] and for other separation methods for which aptamers are often used as affinity probes [13-15].

To improve the development and use of aptamers in a wide range of domains, it is necessary to develop methods allowing a simple, fast and accurate evaluation of the binding parameters, i.e. number of binding sites on the target ( $n$ ) and ligand-site dissociation constant ( $k_d$ ). Indeed, non covalent interaction studies between molecules and/or biomolecules are of great interest in the elucidation of biological processes, in the field of therapeutics and diagnosis as well as for the development of selective and sensitive bioanalytical methods. Methods available for studying biomolecular interactions include spectroscopy, gel filtration chromatography, microdialysis, isothermal calorimetry, surface plasmon resonance and separation techniques such as gel electrophoresis or capillary electrophoresis (CE) [16-18]. Among all these methods, CE offers powerful attributes such as accuracy, low reagent consumption and the possibility to run binding assay in free solution, making this separation technique very attractive and well adapted to the analysis of non-covalent complexes such as aptamer/target ones. Since about 15 years, microchip electrophoresis (MCE) has become a powerful alternative to conventional separation methods. Indeed MCE presents further advantages in terms of speed, low sample and reagent consumption, high throughput and integration capabilities.

In this context, an original and simple methodology based on microchip electrophoresis (MCE) in a continuous frontal analysis mode (that we named frontal analysis continuous microchip electrophoresis, FACMCE) was previously developed for the simultaneous

determination of the binding parameters, i.e.  $k_d$  and  $n$  [48]. The proof of the methodology was exemplified with a system that has never been completely characterized, and presenting some difficulties: a strongly basic protein, lysozyme, and its fluorescently-labelled aptamer. Lysozyme, an acid hydrolase which destructs bacterial cells walls, can be used as biomarker to diagnose or monitor the treatment efficiency of blood diseases such as leukemia [35], or the rejection of organs transplants [36]. Lysozyme has also long been used as a natural antimicrobial agent in food preservation [37]; it can for example be added in wines to control malolactic fermentation [38, 40] and must thus be quantified since it is a potential allergen.

It as already been evidenced that binding between an aptamer and its target is highly dependent on the conformation of the aptamer molecule. This binding may be affected by the nature of the liquid phase, and especially by a variety of cations [14, 49-53]. Thus in a previous work, we reported on the interactions of monovalent or divalent cations with the lysozyme-binding aptamer employed in this study, using affinity capillary electrophoresis in its mobility shift format, in BGEs of different natures (phosphate and MOPS buffers) and ionic strengths [54]. After correction of ionic strength and counterion condensation effects, we evidenced that the aptamer mobility was affected by other phenomena, such as a binary or ternary complexation with the BGE co-ions as well as a possible conformational change when a dication was added. It was thus demonstrated that the electrolyte nature had a strong impact on aptamer conformation.

In this work, the FACME method was used to investigate the interaction between the lysozyme-binding aptamer and its target in order to provide new insights into the influence of various experimental conditions on possible conformation changes of the aptamer, and thus on the binding parameters. Being a strongly basic protein ( $pI = 11.35$ ), lysozyme is positively charged under physiological pH and can strongly adsorb onto the channel wall due to hydrophobic and electrostatic interactions. Thus it seems that the aptamer-lysozyme complex should also adsorb on the channel wall, causing disruption of the interaction. In addition, under physiological pH electrophoretic mobility of the lysozyme-binding aptamer had nearly the same absolute value as the electroosmotic mobility, leading to very long migration times. In order to prevent protein and complex adsorption, and allow for rapid separations, a neutral coating with HPC was performed on the glass microchip as previously described [39]. Several parameters were studied, such as the nature and ionic strength of the separation buffer, the nature and concentration of the divalent cation and the use of a thermal treatment of the sample. The aptamer was labelled with fluorescein, while the protein was label-free. The concentration of the free labelled-aptamer was determined through its plateau height and the

interactions parameters (i.e.,  $k_d$  and  $n$ ) were calculated according to mathematical linearization methods. The influence of various experimental parameters on the aptamer / lysozyme interaction could be highlighted in view of these interaction parameters.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Chemicals and reagents

The 30-mer lysozyme-binding aptamer (5'-FAM/ATC AGG GCT AAA GAG TGC AGA GTT ACT TAG-3') was synthesized, labelled with fluorescein phosphoramidite (FAM) at the 5'-end and HPLC-purified by Eurogentec France (Angers, France) and stored at -18 °C as a 100 µM stock solution in water. Lysozyme from chicken egg white (Mr 14 307), sodium monobasic phosphate, sodium dibasic phosphate, 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid (MOPS), magnesium chloride and calcium chloride were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Hydroxypropylcellulose (Mr 100,000) was purchased from Scientific Polymer Products (Dean PKWY, Ontario, USA). Standard 1 M NaOH solution Normadose was provided by VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

All samples, solutions and buffers were prepared using analytical-grade chemicals and ultra-pure water produced by a Direct-Q3 system (Millipore, Molsheim, France).

### 2.2 MCE instrumentation

Monochannel glass microchips were purchased from Micronit Microfluidics (Enschede, The Netherlands). The separation channel was 7.3 cm in length, 20 µm in depth and 50 µm in width. Upchurch reservoirs from Oak (Harbor, USA) were bonded around the wells to increase the reservoir volume. Microchip analysis was monitored by an IX-71 inverted fluorescence microscopic system (Olympus, France) equipped with a spectral filter 460-490 nm and a 100 W mercury lamp. A XCD-X710 camera (Sony, New-York City, USA) was mounted on the microscope and a NI Vision software (Alliance Vision, France) was used for camera control and image processing. A HVS448 high-voltage power supply (Labsmith, Livermore, USA) was used to apply electric fields to the microchannel through platinum electrodes placed in the reservoirs. All system operations were performed with Labview 7.1 (National Instrument, Austin, USA) programmed through a PC-based computer. All experiments were performed at room temperature.

### 2.3 Procedures

#### 2.3.1 Microchannel coating procedure

The HPC coating procedure was achieved according to the one previously developed by Poitevin et al. [39]. A 5% (w/v) HPC aqueous solution was prepared. The separation

channel was activated by 1 M NaOH and flushed with ultrapure water. Then the channel was filled with the HPC solution from one end of the channel and flushed by air. The two wells were washed with ultra-pure water (Milli-Q) and then liquid in wells was removed. The chip was heated in a GC oven from 60°C to 140°C at 5°C/min, and maintained at 140°C for 30 minutes. After heating, the channel was washed with ultra-pure water. The electroosmotic mobility was estimated according to the procedure developed by Shakalisava et al. [43], which consists in measuring the apparent electrophoretic mobility of 0.01 mg.mL<sup>-1</sup> fluorescein in a 9 mM sodium borate buffer pH 9.2 knowing its electrophoretic mobility in these conditions ( $-38.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

### **2. 3. 2 FACMCE experiments**

Lysozyme and the aptamer were diluted in the separation buffer. When thermal treatment was imposed on the sample, the fluorescently-labelled aptamer was activated by heating at 95°C for 5 min in a water bath and then cooled down to room temperature by itself, before use. After rinsing 3 times with ultrapure water, then with the 30 mM sodium phosphate buffer (PB) (pH 7.5), the separation channel was filled with the separation buffer. One well was filled with the buffer while the other well was filled with the sample, i.e. the aptamer alone or an incubated mixture of aptamer and protein (incubation for about 20 min), respectively. The detector was placed in the middle of the channel (effective length, 3.65 cm). A negative voltage of 2200 V (electric field, 300 V/cm) was applied, the cathode being placed in the sample well, so as to achieve a continuous electrokinetic injection of the sample. Meanwhile, fluorescence signal was recorded.

### 3 Results and discussion

Binding between an aptamer and its target, which is highly dependent on the conformation of the aptamer molecule, may be affected by the nature of the liquid phase, and especially by the presence of various cations [14, 49-53]. In a previous work, we have reported on the interactions of monovalent or divalent cations with a lysozyme-binding aptamer, using affinity capillary electrophoresis in its mobility shift format, in different BGEs of varying natures (phosphate and MOPS buffers) and ionic strengths [54]. After correction of ionic strength and counterion condensation effects, we evidenced that the aptamer mobility was affected by other phenomena in the presence of cations, such as binary or ternary complexation with the BGE co-ions as well as a possible conformational change when a dication was added. It was thus demonstrated that the electrolyte nature had a strong impact on aptamer conformation. Besides, it has already been shown that  $Mg^{2+}$  plays an important role in both the formation and dissociation of aptamer/target binding, as demonstrated for example in the case of theophylline / aptamer complexes [46] and ochratoxin A (a mycotoxin) / aptamer complexes [55].

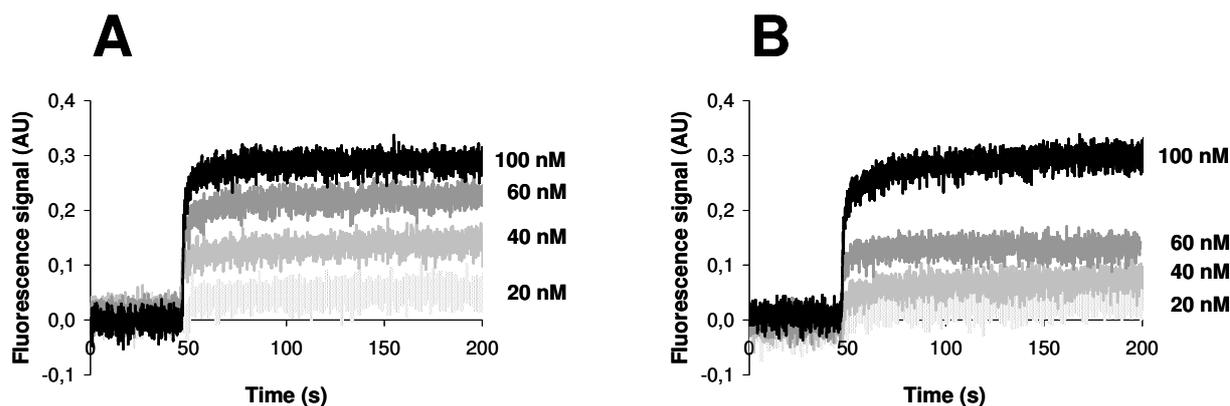
In this work the FACMCE method we previously developed [48] was used to investigate the interaction between the lysozyme-binding aptamer and its target under varying electrolyte compositions, in order to provide new insights into their influence on possible conformation change of the aptamer, and thus on the binding parameters. This original and simple methodology based on microchip electrophoresis (MCE) in a continuous frontal analysis mode enables the simultaneous determination of the binding parameters, i.e. the ligand-site dissociation constant ( $k_d$ ) and the number of binding sites on the substrate ( $n$ ). It consists in injecting continuously and electrokinetically an incubated mixture of substrate and ligand. The determination of the concentration of the free ligand in the mixture thanks to its corresponding plateau height enables to calculate the binding parameters according to mathematical linearization methods [48]. This methodology was successfully applied to determine the binding parameters between the lysozyme-binding aptamer and its target. The aptamer was labelled with fluorescein at the 5'-end of the oligonucleotidic sequence, whereas the protein was label-free. The lysozyme being a very basic protein ( $pI > 11$ ), adsorption was limited by coating the surface of the channel with a neutral polymer, hydroxypropylcellulose (HPC), according to the procedure developed by Poitevin et al. [39]. The strong reduction of the electroosmotic mobility ( $\mu_{eo} < 3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  in 9 mM sodium borate buffer (pH 9.2))

and the repeatability of the migration times (RSD < 3%) reflected the quality and the stability of the channel modification. In order to deeper understand the impact of different experimental parameters on the affinity between the aptamer and lysozyme, the interaction was studied in this work at pH 7.5 while varying the following parameters: (i) the nature of the separation electrolyte : MOPS buffer (MOPS) or sodium phosphate buffer (PB); (ii) the ionic strength of the separation electrolyte (30, 45 or 60 mM); (iii) the nature ( $Mg^{2+}$  or  $Ca^{2+}$ ) and concentration (0, 1 or 10 mM) of a divalent cation added in the separation electrolyte and (iv) the thermal treatment (no treatment or activation by heating at 95°C for 5 min in a water bath and then cooling down to room temperature by itself) of the aptamer before use. The different experimental conditions tested are gathered in Table 1.

**Table 1: binding parameters of the aptamer/protein interaction for various experimental conditions (pH 7.5).** Experimental conditions: 50  $\mu$ m x 20  $\mu$ m x 7.3 cm HPC-coated microchip (detection length, 3.65 cm). Applied voltage: -2.2 kV. Temperature: 25°C. Continuous electrokinetic injection. Sample: aptamer at various concentration, alone or mixed with protein at constant concentration, diluted in the separation electrolyte.

N°	BGE, IS	Dication, concentration	Total IS (mM)	Thermal treatment	Lysozyme concentration	Aptamer range (nM)	$k_d$ (nM)	n
1	MOPS, 30 mM	-	30	Yes	Lysozyme, 100 nM	30 – 100	103.6 ± 11.3	0.52 ± 0.03
2	MOPS, 45 mM	-	45	Yes	Lysozyme, 100 nM	10 – 60	6.8 ± 0.6	0.21 ± 0.01
3	MOPS, 60 mM	-	60	Yes	Lysozyme, 100 nM	10 – 80	8.1 ± 2.2	0.08 ± 0.01
4	MOPS, 30 mM	-	30	-	Lysozyme, 1000 nM	100 – 1000	275.8 ± 144.1	0.31 ± 0.10
5	MOPS, 30 mM	MgCl <sub>2</sub> , 1 mM	33	-	Lysozyme, 100 nM	40 – 200	143.8 ± 30.6	0.51 ± 0.07
6	MOPS, 30 mM	MgCl <sub>2</sub> , 1 mM	33	Yes	Lysozyme, 100 nM	20 – 100	45.5 ± 0.3	0.21 ± 0.00
7	MOPS, 30 mM	MgCl <sub>2</sub> , 10 mM	60	Yes	Lysozyme, 100 nM	10 – 60	18.1 ± 0.8	0.14 ± 0.00
8	MOPS, 30 mM	CaCl <sub>2</sub> , 10 mM	60	Yes	Lysozyme, 100 nM	20 – 80	26.6 ± 6.5	0.43 ± 0.06
9	PB, 30 mM	-	30	Yes	Lysozyme, 100 nM	30 – 100	52.5 ± 3.0	0.25 ± 0.01
10	PB, 30 mM	MgCl <sub>2</sub> , 1 mM	33	Yes	Lysozyme, 100 nM	20 – 80	10.5 ± 0.2	0.26 ± 0.00
11	PB, 30 mM	MgCl <sub>2</sub> , 10 mM	60	Yes	Lysozyme, 100 nM	20 – 80	9.9 ± 0.6	0.33 ± 0.01

Under each condition, aptamer in varying concentrations (10 – 1000 nM range,) was incubated (20 min at 25°C) with lysozyme at a fixed concentration (100 nM to 1000 nM,). In order to achieve accurate comparison, samples containing either only the aptamer or an aptamer/lysozyme mixture were analyzed in parallel for each aptamer concentration. At pH 7.5, the aptamer was negatively charged, as indicated previously, whereas lysozyme was positively charged due to its high isoelectric point (pI = 11.35). Thus under a negative voltage, the free aptamer could migrate into the channel and be detected as the first front according to the electrophoretic mobility determined at the apex of the front derivative (Figure 1).



**Figure 1: electropherograms obtained during FACME analysis of 20, 40, 60 and 100 nM aptamer alone (A) or mixed with 100 nM lysozyme (B).**

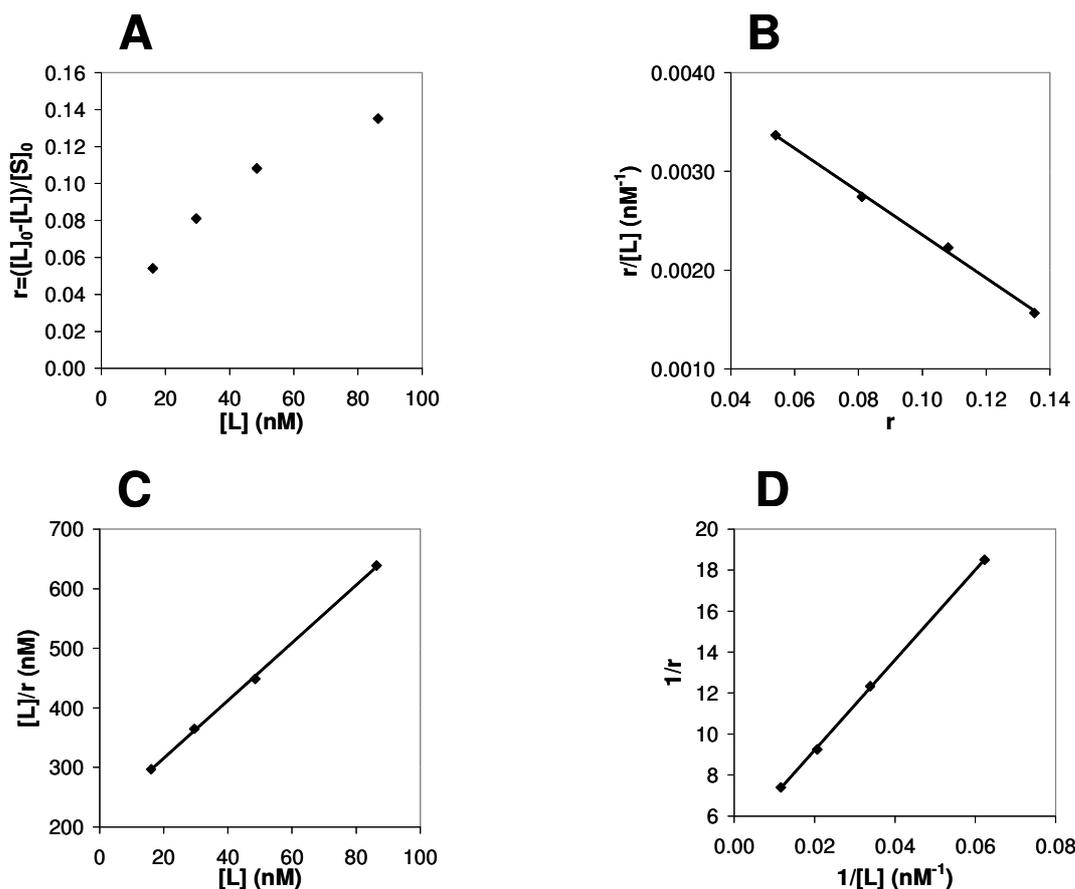
Experimental conditions: 50  $\mu\text{m}$  x 20  $\mu\text{m}$  x 7.3 cm HPC-coated microchip (detection length, 3.65 cm). Background electrolyte: 30 mM MOPS/NaOH, 1 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7.45). Applied voltage: -2.2 kV. Temperature: 25°C. Continuous electrokinetic injection. Sample: 20, 40, 60 and 100 nM aptamer (A) or 20, 40, 60 and 100 nM aptamer mixed with 100 nM lysozyme (B), diluted in the background electrolyte after thermal treatment of the 1  $\mu\text{M}$  stock solution of aptamer (95°C, 5 min).

As expected, the plateau height of the free labelled-aptamer decreased after addition of lysozyme (Figure 1). The aptamer front height allowed the free aptamer concentration determination and further determination of the binding parameters, according to the three linearization methods (Table 2) [48].

**Table 2: linearized forms of the binding isotherm for the determination of  $k_f$  and  $n$  using the continuous FA mode**

Method name	Equation	$k_f$ determination	$n$ determination
x-reciprocal (Scatchard plot)	$\frac{r}{[L]} = nK_f - rK_f$	- Slope	- Intercept/slope
y-reciprocal	$\frac{[L]}{r} = \frac{1}{nK_f} + \frac{[L]}{n}$	Slope/intercept	1/slope
Double-reciprocal	$\frac{1}{r} = \frac{1}{nK_f[L]} + \frac{1}{n}$	Intercept/slope	1/intercept

Figure 2 shows an example of the binding isotherm and its linearized forms obtained in 30 MOPS, containing 1 mM  $\text{MgCl}_2$  and using a thermal treatment (Experiment n°6). For a better visualization of Table 1, the experiments are numbered according to the experimental parameters, rather than to the chronology of presentation in the following text.



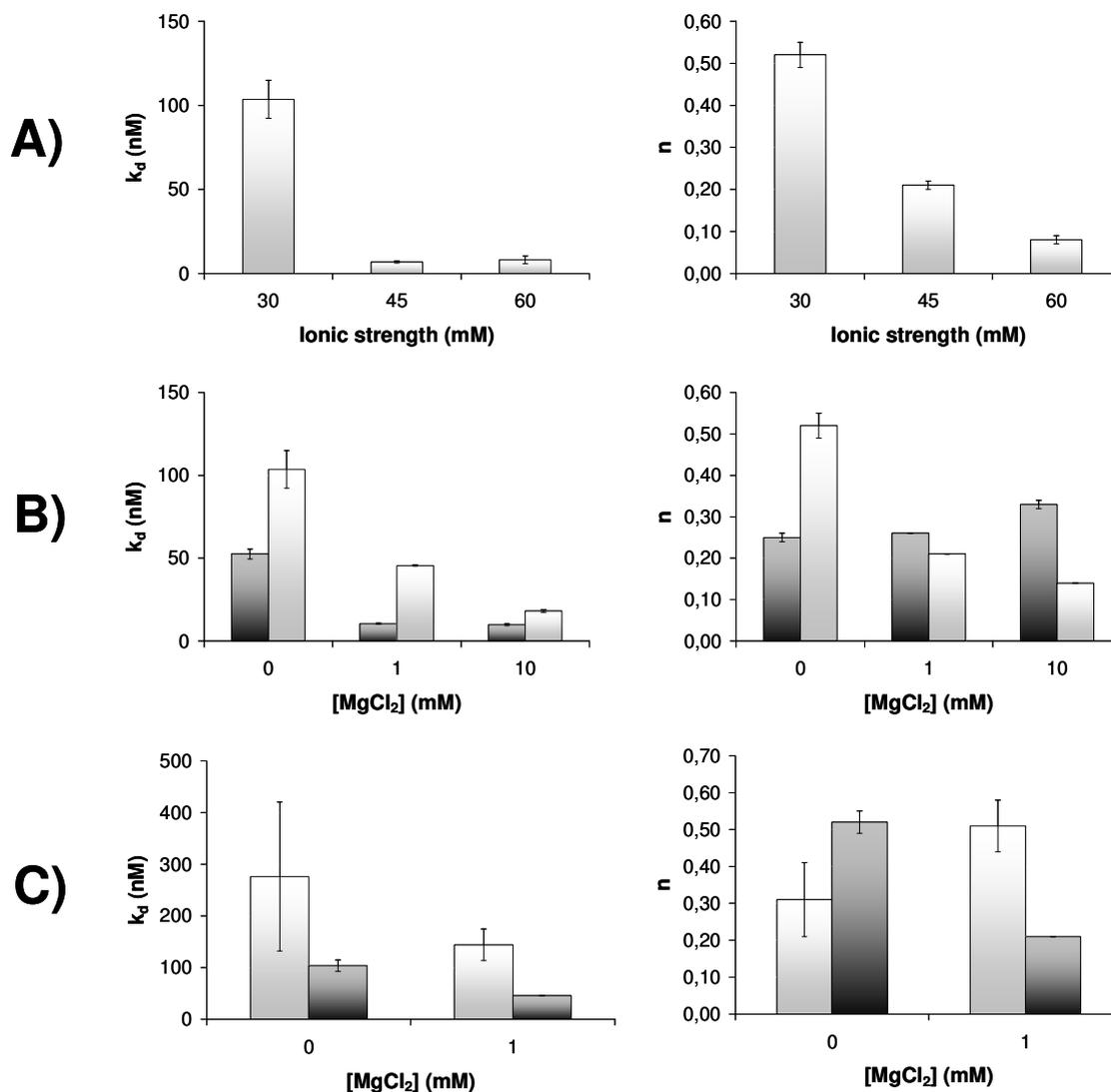
**Figure 2: binding isotherm (A) and its linearization forms according to the x-reciprocal (B), y-reciprocal (C) and double-reciprocal (D) methods from experimental data of Fig. 2.**

Experimental conditions: see Fig. 1. Equations of the least-squares regression straight lines ( $n = 4$ ): (B)  $y = -0.0219x + 0.0045$ ,  $R^2 = 0.9978$ ; (C)  $y = -4.8458x + 218.66$ ,  $R^2 = 0.994$ ; (D)  $y = 220x + 4.8134$ ,  $R^2 = 0.997$ .

### 3.1 Influence of ionic strength on binding parameters

The interaction between lysozyme and its aptamer was studied in MOPS buffers (pH 7.5) of increasing ionic strength: 30, 45 or 60mM, corresponding to experiments n° 1, 2 and 3, respectively. In order to discriminate between ionic strength and dication effects, the experiments were performed without dication in the BGE. Before use, the stock solution of the fluorescently-labelled aptamer was activated by thermal treatment. The dissociation constant decreased with increasing ionic strength (Figure 3A), which seems to indicate that the binding between lysozyme and its aptamer is mainly due to non-ionic interactions. Indeed, increasing ionic strength results in a stronger shielding of the compounds charge by counterions, leading to weaker electrostatic interactions and thus favouring non-ionic binding. More precisely, the dissociation constant decreased greatly between 30 and 45 mM ionic strength (around 90%), whereas it was of the same order of magnitude for 45 and 60 mM ionic strength ( $6.8 \pm 0.6$  nM and  $8.1 \pm 2.2$  nM, respectively). This means that the interactions

are essentially non-ionic for ionic strengths higher than 45 mM, whereas some electrostatic attraction still occurs at 30 mM ionic strength, leading to less specific interaction.



**Figure 3:** dissociation constant and binding ratio  $n$  of the lysozyme-aptamer interaction (A) in MOPS buffer (pH 7.5), according to the buffer ionic strength; (B) in 30 mM PB (dark grey) or MOPS (light grey) buffer, according to the magnesium concentration; (C) in 30 mM MOPS buffer, with (dark grey) or without (light grey) thermal treatment of the 1  $\mu$ M stock solution of aptamer (95°C, 5 min).

Experimental conditions: 50  $\mu$ m x 20  $\mu$ m x 7.3 cm HPC-coated microchip (detection length, 3.65 cm). Applied voltage: -2.2 kV. Temperature: 25°C. Continuous electrokinetic injection. Sample: aptamer at various concentrations mixed with 100 nM lysozyme, diluted in the background electrolyte.

Few studies have been performed on the influence of ionic strength on the aptamer/target interaction. It was shown that ionic strength had little effect on the interaction between ochratoxin A and its aptamer [55]. Hianik and coworkers showed that increasing ionic strength seems to result in weakening the binding of thrombin to its aptamer due to the shielding effect of sodium counterions [56], but the complexation included a third component, methylene blue, used as an electrochemical mediator, which does not allow to evidence any direct influence on the aptamer/target interaction. In case of interactions between porphyrins

and double stranded DNA, Sulyman et al showed a stronger binding for lower ionic strength due to different binding modes [57]. Nevertheless, the results obtained with a double helix DNA can not be directly compared to the ones obtained with aptamer. Furthermore, it has to be noticed that in all these cases, the target was anionic, whereas lysozyme is cationic in the conditions of this study. The increase in ionic strength also led to a decrease in the binding ratio  $n$  (Figure 3A), which seems consistent with results concerning dissociation constant and could reflect a change of binding mode as demonstrated in the case of the binding of porphyrins to DNA [57].

### 3.2 Influence of separation electrolyte composition and dication nature and concentration on binding parameters

The interaction was studied in 30 mM MOPS electrolytes (pH 7.5) containing increasing concentrations of  $MgCl_2$ : 0, 1 or 10 mM, corresponding to experiments n°1, 6 and 7 (Table 1). Before use, the fluorescently-labelled aptamer diluted in the separation buffer was activated by thermal treatment. The results obtained evidence that even in absence of  $Mg^{2+}$ , a binding constant in the range of expected values was obtained contrary to the results obtained in case of the interaction between ochratoxin A and its aptamer [55]. These controversial results could be explained by the cationic charge of lysozyme in these conditions. Furthermore, Figure 3B shows that the dissociation constant drastically decreased upon addition of magnesium. This can be compared with the results from Cruz-Aguado et al showing that the dissociation constant of the ochratoxin A / aptamer complex decreased with increasing divalent cation concentration [55]. The authors indicated that ochratoxin A presumably likely forms a coordination complex with magnesium or calcium with both the carboxyl and the hydroxyl groups of the target. The dissociation constant decrease we observed with increasing  $Mg^{2+}$  concentration could be related to a change in conformation of the aptamer upon complexation with a divalent cation, or to the increase of ionic strength, as shown previously. Indeed, the electrolyte ionic strength was doubled when 10 mM  $MgCl_2$  was added to the 30 mM buffer. Upon addition of 10 mM  $MgCl_2$ , the dissociation constant was reduced by around 80%, which is quite similar to the 90% decrease observed in MOPS buffer, in absence of divalent cation, between 30 mM and 60 mM ionic strength. However, when 1 mM  $MgCl_2$  was added, a great decrease of the dissociation constant was observed (-60% in MOPS), which cannot be attributed only to the small ionic strength increase (33 mM instead of 30 mM). This clearly means that addition of magnesium to the buffer improves the

binding affinity of the aptamer, not only via an increase of ionic strength but also via another contribution. In a previous study dealing with the interaction between the lysozyme-binding aptamer and various cations [54] in absence of lysozyme, we have shown that, apart from ionic strength and counterion condensation effects, additional phenomena in presence of divalent cations such as conformational change or binary or ternary complexation with the buffer co-ion could also occur. Furthermore,  $n$  was greatly reduced upon addition of magnesium (Figure 3B), which could reflect a change in binding mode.

In order to check the influence of the dication nature, the interaction was also studied in a 30 mM MOPS buffer containing 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (Experiment n°8, Table 1). The dissociation constant obtained is slightly higher than the one observed with  $\text{Mg}^{2+}$  in the same conditions ( $26.6 \pm 6.5$  mM instead of  $18.1 \pm 0.8$  nM), nevertheless the difference can not be considered significant given the accuracy of the results. On the other hand, the number of binding sites  $n$  is higher with  $\text{Ca}^{2+}$  than with  $\text{Mg}^{2+}$  ( $0.43 \pm 0.06$  instead of  $0.14 \pm 0.00$ ), meaning that the lysozyme-aptamer interaction doesn't follow the same binding procedure in presence of either  $\text{Mg}^{2+}$  or  $\text{Ca}^{2+}$ . These results can be correlated to the previous ones [54], where it was demonstrated, in the same experimental conditions, that the affinity of dication for this aptamer decreased from  $\text{Mg}^{2+}$  to  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$ . Thus the stabilization of the more affine conformation of the aptamer should be greater in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$  than in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , which is consistent with the  $k_d$  values obtained in this study.

### 3.3 Influence of electrolyte nature on binding parameters

To further investigate the parameters influencing the non-covalent interaction between aptamer and lysozyme, the nature of the BGE has been varied. Figure 3B shows that the nature of the buffer had an influence on the binding affinity: the dissociation constant was more than 50% higher in MOPS than in PB. This again has to be correlated to our previous study, as it was observed that some complexation occurred between the aptamer and the buffer components [54]. Indeed, in MOPS buffer, it was assumed that a competition occurs between the dication and the MOPS zwitterions for the binding with the aptamer. The complexation with MOPS would lead to steric hindrance, thus blocking the stronger site of the aptamer to the dication. In PB buffer, the formation of a ternary complex aptamer/dication/phosphate could stabilize these binding sites (the dication being sandwiched between two phosphate residues) and favor the interaction between the aptamer and the

dication. Thus PB seems to help for dication interaction with the aptamer, which should help for the aptamer conformation to be more affine to its target.

As previously demonstrated, when introducing  $Mg^{2+}$  in both electrolytes, the dissociation constant decreased with increasing  $Mg^{2+}$  concentration (Figure 3B). When 1 mM  $MgCl_2$  was added, the decrease in  $k_d$  value was greater in PB than in MOPS buffer (-80% and -60%, respectively). This can be correlated to the cation/aptamer affinity as it has been demonstrated [54] that at low dication concentration (0-1 mM), this interaction is stronger in PB than in MOPS. This stronger aptamer- $Mg^{2+}$  interaction could thus favour the binding with lysozyme via a conformational change of the aptamer.

Besides, the variation of the binding ratio  $n$  also differed according to the nature of the binding buffer (Figure 3B). In absence of  $Mg^{2+}$ ,  $n$  was higher in MOPS than in PB, whereas it was lower when magnesium was added to the buffer. This could be correlated to the fact that in absence of  $Mg^{2+}$ , only MOPS could induce a change in conformation of the aptamer via the binary complex, thus allowing for better interaction. In MOPS buffer,  $n$  was greatly reduced upon addition of  $Mg^{2+}$ , which reflects a change of binding mode and/or an amplification of selectivity. Meanwhile, in PB buffer,  $n$  was quite stable, and even slightly increased when 10 mM magnesium was added. This latter evolution can be due to the stabilization of the affine conformation of the aptamer in presence of the ternary complex: aptamer/dication/PB, which increases with dication concentration.

### 3.4 Influence of thermal treatment

The interaction was studied in a 30 mM MOPS buffer (pH 7.5) containing 0 or 1 mM  $MgCl_2$ , with (Experiment n°1 and 6, Table 1) or without (Experiment n°4 and 5, Table 1) activation of the stock solution of the fluorescently-labelled aptamer by thermal treatment before use. Figure 3C shows that in absence of divalent cation, the interaction between lysozyme and its aptamer is weaker without thermal treatment. These results also confirm that as previously, in both cases  $MgCl_2$  addition increased the binding strength between lysozyme and its aptamer. Nevertheless, in the presence of  $Mg^{2+}$  and despite the fact that the sole presence of dication should stabilize the aptamer conformation, the binding affinity remains stronger when a thermal treatment is applied. This is in good agreement with the fact that heating the aptamer solution helps to stabilize the optimal conformation for further binding, and then improves the aptamer affinity. In absence of  $MgCl_2$  in the separation electrolyte, the binding ratio  $n$  increased (+70%) when a thermal treatment was applied whereas in presence

of 1 mM MgCl<sub>2</sub>, the binding ratio decreased (-60%) when a thermal treatment was applied (Figure 3C). It seems that in absence of magnesium, the thermal treatment leads to more binding sites with stronger affinity. In the presence of 1 mM MgCl<sub>2</sub>, the thermal treatment leads to higher affinity but with less binding sites, maybe due to higher specificity. In addition, the use of a thermal treatment step led to a better repeatability of the measurements as well as a smaller standard deviation on the binding parameters values.

## Concluding remarks

In this work, FACMCE was used to investigate the interaction between the lysozyme-binding aptamer and its target in order to provide new insights into the influence of various experimental conditions on possible conformation change of the aptamer, and thus on the binding parameters. In order to overcome the difficulties raised by the strong basicity of the protein, the separation channel was permanently coated with a neutral polymer, the hydroxypropylcellulose (HPC), which allowed a strong reduction of the electroosmotic mobility.

Several parameters were studied: nature and ionic strength of the separation electrolyte, nature and concentration of a divalent cation and the use of a thermal treatment of the sample. Increasing ionic strength led to a decrease of the dissociation constant, which seems to indicate that the binding with lysozyme and its aptamer is mainly due to non-ionic interactions, as well as a decrease of the binding ratio, which reflects a change of binding mode [54]. The addition of a divalent cation to the buffer improved the binding affinity of the aptamer, via an increase of ionic strength coupled to another phenomenon which could be a conformational change. The nature of the buffer and of the dication added also had an influence on the binding parameters of the aptamer-lysozyme interaction, which leads support to the possibility of binary or ternary complexes between the aptamer, the dications and the buffer co-ion, as already demonstrated in our previous work [54]. Finally, it was observed that heating the aptamer solution before use helped to stabilize the optimal conformation, leading to an improved binding affinity as well as a smaller standard deviation on the binding parameters values.

Thus, the influence of various experimental parameters on the aptamer-target interaction was clarified. This will also help us to optimize the operating conditions for further study, for example when investigating the interaction between lysozyme and aptamer-grafted nanoparticles, so as to develop new diagnostic systems or bioanalytical tools.

### 3.3. Conclusion

Au cours de ce travail, la méthodologie FACMCE a été employée pour étudier l'interaction entre l'aptamère anti-lysozyme et sa cible, de façon à fournir des informations nouvelles sur l'influence de diverses conditions expérimentales sur un éventuel changement de conformation de l'aptamère, et donc sur les paramètres d'interaction. Afin de pallier les difficultés engendrées par la forte basicité de la protéine, le canal de séparation a été modifié de façon permanente par un polymère neutre, l'hydroxypropylcellulose (HPC), conduisant ainsi à une forte diminution de l'écoulement électroosmotique.

Plusieurs paramètres ont été étudiés : nature et force ionique de l'électrolyte de séparation, nature et concentration du cation divalent et réalisation d'un traitement thermique préalable de l'aptamère. L'augmentation de la force ionique de l'électrolyte entraîne une diminution de la constante de dissociation, ce qui semble indiquer que l'interaction entre le lysozyme et son aptamère est essentiellement de nature non ionique ; en outre, une diminution du nombre de sites sur le lysozyme est observé, ce qui pourrait refléter un changement de mode de liaison et/ou une augmentation de la sélectivité. L'ajout d'un cation divalent dans l'électrolyte améliore l'affinité de l'aptamère, via une augmentation de la force ionique couplée à un autre phénomène qui pourrait être un changement conformationnel. La nature de l'électrolyte et du dication ont également une influence sur les paramètres de l'interaction aptamère/lysozyme, ce qui est cohérent avec l'hypothèse de la formation de complexes binaires ou ternaires entre l'aptamère, le dication et le co-ion de l'électrolyte envisagée dans notre précédente étude [54]. Finalement, nous avons remarqué que le chauffage préalable de la solution d'aptamère contribuait sans doute à la stabilisation de la conformation optimale, conduisant ainsi à une amélioration de l'affinité et à une meilleure précision des valeurs des paramètres d'interaction.

Ainsi, cette étude a permis de préciser l'influence de divers paramètres expérimentaux sur l'interaction aptamère/cible. Ce travail nous aidera également à optimiser les conditions opératoires en vue d'études futures, par exemple lors de la caractérisation de l'interaction entre le lysozyme et l'aptamère greffé sur des nanoparticules, dans le cadre du développement de nouveaux systèmes de diagnostic ou d'outils bioanalytiques.

## Conclusion

Une nouvelle méthodologie basée sur l'analyse frontale électrocinétique continue en microsysteme (FACMCE) a été développée pour la détermination simultanée, rapide et simple de la constante d'interaction et de la stoechiométrie d'un système. Ceci a été illustré par l'interaction entre un aptamère dirigé contre le lysozyme et sa cible. Afin de surmonter les difficultés engendrées par la forte basicité du lysozyme, le canal de séparation a été modifié de façon permanente par un polymère neutre, l'hydroxypropylcellulose (HPC), ce qui a également permis de réduire fortement le flux électroosmotique.

Dans une première étude, les conditions de travail ont été optimisées, puis les paramètres d'interaction ont été déterminés à partir de la hauteur du plateau de l'aptamère libre, à l'aide de trois méthodes de linéarisation mathématique. Les résultats obtenus ont montré que l'interaction entre le lysozyme et son aptamère mettait en jeu deux sites d'affinité différente. Les deux configurations testées (aptamère variable / lysozyme constant et lysozyme variable / aptamère constant) ont conduit à des résultats similaires, bien que le traitement des données diffère légèrement. La configuration pour laquelle l'aptamère (composé directement détectable) est en concentration variable et le lysozyme à une concentration fixe permet un accès plus facile et direct aux paramètres de l'interaction, et sera ainsi préférentiellement employée. L'intérêt de la FACMCE pour la caractérisation de tous types d'interactions aptamère-protéine a ainsi été démontré.

Cette méthode a également été employée dans une seconde étude afin d'étudier plus précisément l'influence des différents paramètres opératoires sur l'interaction aptamère/cible : nature et force ionique de l'électrolyte de séparation, nature et concentration du cation divalent et réalisation d'un traitement thermique préalable de l'aptamère. L'augmentation de la force ionique de l'électrolyte entraîne une diminution de la constante de dissociation, ce qui semble indiquer le caractère essentiellement non ionique de l'interaction aptamère/lysozyme ; en outre, une diminution du nombre de sites sur le lysozyme est observée, ce qui pourrait refléter un changement de mode de liaison et/ou une augmentation de la sélectivité. L'amélioration de l'affinité observée lors de l'ajout d'un cation divalent dans l'électrolyte pourrait être en partie liée à un changement conformationnel. La nature de l'électrolyte et du cation ont également une influence sur les paramètres de l'interaction aptamère/lysozyme, ce qui est cohérent avec l'hypothèse de la formation de complexes binaires ou ternaires entre

l'aptamère, le dication et le co-ion de l'électrolyte. Finalement, le chauffage préalable de la solution d'aptamère semble contribuer à la stabilisation de la conformation optimale de l'aptamère. Outre son intérêt pour la compréhension des mécanismes d'interaction aptamère/cible, ce travail nous permettra également d'optimiser les conditions opératoires en vue d'études futures, par exemple lors de la caractérisation de l'interaction entre le lysozyme et l'aptamère greffé sur des nanoparticules, dans le cadre du développement de nouveaux systèmes de diagnostic ou d'outils bioanalytiques.

## Références bibliographiques

- [1] Famulok, M., Mayer, G., Blind, M., *Acc. Chem. Res.* 2000, *33*, 591-599.
- [2] Jayasena, S. D., *Clin. Chem.* 1999, *45*, 1628–1650.
- [3] Mairal, T., Özalp, V. C., Sánchez, P. L., Mir, M., *et al.*, *Anal. Biochem.* 2008, *390*, 989-1007.
- [4] Stoltenburg, R., Reinemann, C., Strehlitz, B., *Biomol. Engineering* 2007, *24*, 381-403.
- [5] Le Floch, F., Ho, H. A., Leclerc, M., *Anal. Chem.* 2006, *78*, 4727-4731.
- [6] Sampson, T., *World Patent Information* 2003, *25*, 123–129.
- [7] Mosing, R. K., Bowser, M. T., *J. Sep. Sci.* 2007, *30*, 1420-1426.
- [8] Famulok, M., Hartig, J. S., Mayer, G., *Chem. Rev.* 2007, *107*, 3715-3743.
- [9] Ravelet, C., Grosset, C., Peyrin, E., *J. Chromatogr. A* 2006, *1117*, 1-10.
- [10] Minunni, M., Tombelli, S., Gulotto, S., Luzi, A., Mascini, M., *Biosens. Bioelec.* 2004, *20*, 1149-1156.
- [11] Liss, M., Petersen, B., Wolf, H., Prohaska, E., *Anal. Chem.* 2002, *74*, 4488-4495.
- [12] Kirby, R., Cho, E. J., Gehrke, B., Bayer, T., *et al.*, *Anal. Chem.* 2004, *76*, 4066-4075.
- [13] Michaud, M., Jourdan, E., Villet, A., Ravel, A., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, *125*, 8672-8679.
- [14] Clark, S. L., Remcho, V. T., *Anal. Chem.* 2003, *75*, 5692-5696.
- [15] Clark, S. L., Remcho, V. T., *Electrophoresis* 2002, *23*, 1335–1340.
- [16] Østergaard, J., Heegaard, N. H. H., *Electrophoresis* 2003, *24*, 2903-2913.
- [17] Rundlett, K. L., Armstrong, D. W., *Electrophoresis* 2001, *22*, 1419-1427.
- [18] Oravcova', J., Böhs, B., Lindner, W., *j. Chromatogr. B* 1996, *677*, 1-28.
- [19] Shimura, K., Kasai, K.-i., *Anal. Biochem.* 1997, *251*, 1-16.
- [20] Varenne, A., Gareil, P., Collic-Jouault, S., Daniel, R., *Anal. Biochem.* 2003, *315*, 152-159.
- [21] Le Saux, T., Varenne, A., Perreau, F., Siret, L., *et al.*, *J. Chromatogr. A* 2006, *1132*, 289-296.
- [22] Nilsson, M., Johansson, G., Isaksson, R., *Electrophoresis* 2004, *25*, 1022-1027.
- [23] Busch, M. H. A., Boelens, H. F. M., Kraak, J. C., Poppe, H., *J. Chromatogr. A* 1997, *775*, 313-326.
- [24] Rudnev, A. V., Aleksenko, S. S., Semenova, O., Hartinger, C. G., *et al.*, *J. Sep. Sci.* 2005, *28*, 121-127.
- [25] Heegaard, N. H. H., Nilsson, S., Guzman, N. A., *j. Chromatogr. B* 1998, *715*, 29-54.
- [26] Rundlett, K. L., Armstrong, P. D. W., *Electrophoresis* 1997, *18*, 2194-2202.
- [27] Gao, J. Y., Dubin, P. L., Muhoberac, B. B., *Anal. Chem.* 1997, *69*, 2945-2951.
- [28] Gong, M., Nikcevic, I., Wehmeyer, K. R., Limbach, P. A., Heineman, W. R., *Electrophoresis* 2008, *29*, 1415-1422.
- [29] Berezovski, M., Nutiu, R., Li, Y., Krylov, S. N., *Anal. Chem.* 2003, *75*, 1382-1386.
- [30] German, I., Buchanan, D. D., Kennedy, R. T., *Anal. Chem.* 1998, *70*, 4540-4545.
- [31] Gong, M., Wehmeyer, K. R., Limbach, P. A., Heineman, W. R., *Electrophoresis* 2007, *28*, 837-842.
- [32] Wiegand, T. W., Williams, P. B., Dreskin, S. C., Jouvin, M.-H., *et al.*, *J. Immunol.* 1996, *157*, 221-230.
- [33] Le Saux, T., Hisamoto, H., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2006, *1104*, 352-358.
- [34] Liu, X., Gomez, F. A., *Anal. Biochem.* 2009, *393*, 615-621.

- [35] Sexton, C., Buss, D., Powell, B., O'Connor, M., *et al.*, *Leukemia Research* 1996, 20, 467-472.
- [36] Jones, J. W., M.D., J., M.D., S. S., B.A., M. B. J., *et al.*, *Journal of Surgical Research* 1998, 84, 134-137.
- [37] Proctor, V. A., Cunningham, F. E., *Food Sci. Nutr.* 1988, 26, 4.
- [38] Marchal, R., Chaboche, D., Marchal-Delahaut, L., Gerland, C., *et al.*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48, 3225-3231.
- [39] Poitevin, M., Shakalisava, Y., Miserere, S., Peltre, G., *et al.*, *Electrophoresis* 2009, 30, 4256-4263.
- [40] Simó, C., Elvira, C., González, N., Román, J. S., *et al.*, *Electrophoresis* 2004, 25, 2056-2064.
- [41] Connors, K. A., *Binding constants. The measurements of molecular complex stability.*, John Wiley & Sons, New York 1987.
- [42] Bowser, M. T., Chen, D. D. Y., *Journal of Physical Chemistry A* 1999, 103, 197-202.
- [43] Shakalisava, Y., Poitevin, M., Viovy, J.-L., Descroix, S., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 1030-1033.
- [44] Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O., Yarus, M., *Annu. Rev. Biochem.* 1995, 64, 763-797.
- [45] Cox, J. C., Ellington, A. D., *Bioorg. Med. Chem.* 2001, 9, 2525-2531.
- [46] Latham, M. P., Zimmermann, G. R., Pardi, A., *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 5052-5053.
- [47] Xia, J., Dubin, P. L., *J. Chromatogr. A* 1994, 667, 311-315.
- [48] Girardot, M., Li, H.-Y., Descroix, S., Varenne, A., *Analytical Chemistry*, submitted.
- [49] Huang, C.-C., Chang, H.-T., Cao, Z., Tan, W., *Anal. Chem.* 2004, 76, 6973-6981.
- [50] Szilagy, A., K. Bonn, G., Guttman, A., *J. Chromatogr. A* 2007, 1161, 15-21.
- [51] Guillaume, Y.-C., André, C., Xicluna, A., *Electrophoresis* 2005, 26, 3247-3255.
- [52] Gebhardt, K., Shokraei, A., Babaie, E., Lindqvist, B. H., *Biochem.* 2000, 39, 7255-7265.
- [53] Wöhnert, J., Noeske, J., Schwalbe, H., *Nucl. Acids res.* 2007, 35, 5262-5273.
- [54] Girardot, M., Gareil, P., Varenne, A., *Electrophoresis* 2010, 31, 546-555.
- [55] Cruz-Aguado, J. A., Penner, G., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, 56, 10456-10461.
- [56] Hianik, T., Veronika Ostatná, Sonlajtnerova, M., Grman, I., *Bioelectrochem.* 2007, 70, 127-133.
- [57] Sulyman, S. A. A., Ghazaryan, A. A., Dalyan, Y. B., *Armenian Journal of Physics* 2009, 2, 139-145.

# **Chapitre V**

**Caractérisation de nanoparticules  
fonctionnalisées par l'aptamère anti-  
lysozyme**

## Introduction

Les nanoparticules (NPs) soulèvent un intérêt croissant dans de nombreux domaines de recherche, tels que les nanotechnologies [1], la médecine [2] et le diagnostic [3, 4]. Le développement d'outils de bio-reconnaissance moléculaire nécessite souvent de modifier la surface des NPs de façon à leur apporter des propriétés adéquates. Dans le domaine des aptamères, des NPs magnétiques fonctionnalisées par la cible peuvent être employées lors de la phase de sélection, ce qui permet de séparer aisément les séquences libres et liées par application d'un champ magnétique [5]. En outre, des NPs modifiées par des aptamères ont été employées, principalement dans le domaine biomédical et en particulier pour le diagnostic et le traitement du cancer : purification [5], collection [6, 7], détection [6-8] et amplification du signal [9-11] de protéines ou de cellules cibles, ainsi que ciblage [12], imagerie et thérapie. Différents sortes de NPs ont été utilisées, telles que des NPs d'oxyde de fer magnétiques [5, 6, 13], des NPs fluorescentes [6] ou des NPs d'or [8, 10, 11]. Selon la nature des NPs, le greffage de l'aptamère peut être effectué de différentes manières, telles que (i) la formation d'une liaison amide entre un aptamère modifié par une fonction amine et des NPs portant des groupements  $-COOH$  activés par EDC/NHS [6, 12, 13], (ii) la formation d'une liaison métal-soufre entre un aptamère modifié par une fonction thiol et des NPs d'or [8, 9, 11], ou (iii) la formation d'un pont biotine-streptavidine entre un aptamère biotinylé et des NPs recouvertes de streptavidine [10].

Dans ce contexte, l'électrophorèse capillaire apparaît comme une alternative simple et rapide aux techniques conventionnelles utilisées pour la caractérisation de NPs [14]. En effet, elle fournit des informations sur la distribution en taille [15, 16], la densité de charge surfacique [17] ou les coefficients de diffusion [18], et elle permet de séparer différentes populations de NPs [19, 20]. Des points quantiques [21, 22] ou des NPs [23, 24] fonctionnalisés par des protéines ont été caractérisés par CE, mais à notre connaissance aucune étude n'existe en ce qui concerne l'analyse de NPs modifiées par des aptamères, étape nécessaire en vue de leur utilisation comme outils de bio-reconnaissance.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons au greffage de l'aptamère anti-lysozyme sur des NPs magnétiques en vue du développement d'outils de bio-reconnaissance moléculaire. Après avoir montré la faisabilité de la fonctionnalisation de nanoparticules magnétiques cœur / coquille par l'aptamère et caractérisé par électrophorèse capillaire de zone (CZE) les objets

obtenus en termes de taux de greffage, de comportement électrophorétique et de stabilité colloïdale, nous étudierons l'interaction entre l'aptamère greffé et sa cible, le lysozyme, afin de mettre en lumière l'influence de l'immobilisation de l'aptamère sur son affinité. La détermination des paramètres de l'interaction sera effectuée par FACMCE, selon la procédure développée pour l'étude de l'interaction aptamère libre – lysozyme.

# 1. Caractérisation par électrophorèse capillaire de zone de nanoparticules fonctionnalisées par l'aptamère anti-lysozyme

## 1.1. Introduction

Cette étude vise à montrer l'intérêt de l'emploi de nanoparticules (NPs) fonctionnalisées par des aptamères en tant qu'outils de bio-reconnaissance dans des systèmes électrophorétiques. Dans ce but, quatre types de NPs maghémite/silice cœur/coquille, fonctionnalisées ou non par l'aptamère anti-lysozyme modifié par une chaîne aminée de longueur variable, ont été caractérisées par électrophorèse capillaire de zone (CZE).

Dans un premier temps, le taux de greffage a été estimé à l'aide de l'appareillage de CE. Le comportement électrophorétique, la stabilité et la dispersion électrophorétique des NPs soumises à un champ électrique ont ensuite été étudiés, de façon à déterminer les conditions de séparation optimales en termes de force ionique, pH et nature de l'électrolyte de séparation, de température et de champ électrique. Ces résultats seront utiles pour la caractérisation ultérieure de l'interaction entre l'aptamère greffé sur les NPs et sa cible, en format électrophorétique, en vue de l'emploi de ces objets comme outils de bio-reconnaissance moléculaire.

## 1.2. Article

# Aptamer-grafted maghemite / silica core-shell nanoparticles as potential biorecognition tools: an electrophoretic characterization

**Keywords:** Grafted nanoparticle / Aptamer / Capillary electrophoresis / pH, ionic strength, temperature, counter- and co-ion effects / Electric field strength effect

**Abbreviations:** APTS, 3-aminopropyltriethoxysilane / EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide / MES, 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid / MOPS, 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid / NP, nanoparticle / PEOS, 2-(methoxy(polyethyleneoxy)propyl)trimethoxysilane / TAPS, N-tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid / TEOS, tetraethylorthosilicate / TRIS, tris(hydroxymethyl)aminoethane

## Abstract

Capillary electrophoresis was used for the first time to characterize aptamer-grafted nanoparticles (NPs) in view of proving their interest as bio-recognition tools in electrophoretic systems. For this purpose, four types of maghemite / silica core-shell NPs, either non-grafted or grafted with a lysozyme-binding aptamer of different primary amino chains, were characterized by capillary zone electrophoresis (CZE). In a first study, the grafting rate was estimated by the CE instrumentation as around 50-60 aptamers per NP. In a second step, the electrophoretic behaviour, stability and peak dispersion of the grafted NPs under an electric field was estimated, so as to determine the optimal separation conditions, in terms of ionic strength, buffer pH and nature, temperature and electric field strength. In the 5 – 9 pH range, the NPs were stable and their electrophoretic mobility gradually increased in absolute value, while increasing pH. For pH lower than 5, the NPs' net effective charge was close to zero, which led to some aggregation. At pH 7.2 no sign of aggregation was observed on the electrophoretic profiles in the 10 – 100 mM ionic strength range and in the 15 – 60°C temperature range, indicating that either non-grafted or grafted NPs were stable under these conditions. Temperature seems to have all the same an appreciable effect on zeta ( $\zeta$ ) -potential and probably a slight one on aptamer configuration as well. No significant effect of electric field on the electrophoretic mobilities and profiles of all NPs in the 50 – 900 V.cm<sup>-1</sup> range was evidenced. Finally, we evidenced a strong influence of the buffer nature on the electrophoretic mobility and peak dispersion of the NPs, indicating some interactions between the buffer components and the aptamer-grafted NPs. These informations are crucial for estimating the potentialities of these biorecognition tools in electrophoretic systems.

# 1 Introduction

Aptamers are single-stranded DNA or RNA oligonucleotide sequences which show specific binding affinity towards various targets, ranging from small molecules to proteins, and even whole cells [25-27]. These synthetic molecules are isolated from random-sequence pools by *in vitro* selection thanks to a molecular evolution technique named SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) [28-30]. Aptamers are considered as a nucleic acid version of antibodies, with additional advantages such as high affinity and increased thermal stability, tolerance to wide ranges of pH and salt concentration, low cost, small size, ease of synthesis and labelling. Aptamers can thus be widely employed as sensitive diagnosis agents, biomedical research tools and even therapeutics [31-33]. Aptamers have also demonstrated their ability to replace antibodies or bio-mimetic receptors for the development of acoustic or optical biosensors [34-36] and for other separation methods for which aptamers are often used as affinity probes [37-39].

On the other part, the use of nanoparticles (NPs) raises a growing interest in various current and emerging fields of research, such as nanotechnologies [1], medicine [2] and diagnosis assays [3, 4]. So as to develop NP-based bio-recognition tools, modification of the NPs surface is often required in order to bring them suitable functionalities. In the context of aptamers, NPs functionalized with the target can be used during the aptamer selection process, enabling an easy partition of bound and free sequences through magnetic separation [40]. Furthermore, aptamer-modified NPs have been reported, mostly for biomedical purposes and especially for cancer diagnosis and therapy: purification [40], collection [7, 41], detection [7, 41, 42] and signal amplification [9-11] of target proteins or cells, as well as targeting [12], imaging and therapy [13]. Various kinds of NPs have been used, such as magnetic iron oxide NPs [13, 40, 41], fluorescent NPs [41] or gold NPs [10, 11, 42]. According to the nature of the NPs, the grafting of the aptamer can be achieved in several ways, such as (i) formation of an amide bond between a  $\text{NH}_2$ -modified aptamer and  $\text{COOH}$ -modified NPs, via EDC/NHS activation [12, 13, 41]; (ii) formation of a metal-sulfur bond between a thiol-modified aptamer and gold NPs [9, 11, 42]; and (iii) formation of a biotin-streptavidin link between a biotinylated aptamer and NPs coated with streptavidine [10].

Capillary electrophoresis appears as a fast and high through-put alternative to conventional techniques used for NPs' characterization [14]. Indeed it provides information about NPs' size distribution [15, 16], surface charge density [17] or diffusion coefficient [18],

and it allows the separation of different populations of NPs [19, 20]. Protein-grafted quantum dots (QDs) [21, 43] or NPs [23, 24] have been characterized by CE, but to our knowledge no work has reported the CE analysis of NPs modified with aptamers, which is crucial for further use as bio-recognition tools.

In this work, we aim to prove the interest of aptamer-grafted NPs as bio-recognition tools in electrophoretic systems. For this purpose, four types of maghemite / silica core-shell NPs either non-grafted or grafted with a lysozyme-binding aptamer of different primary amino chains were characterized by CZE. In a first study, the grafting rate was estimated by the CE instrumentation. In a second step, the electrophoretic behaviour, stability and peak dispersion of the grafted NPs under an electric field was estimated, so as to determine the optimal separation conditions, in terms of buffer ionic strength, pH and nature, temperature and electric field strength. These results will help for further characterization of the interaction between these aptamer-modified NPs and their target in an electrophoretic format, so as to employ them as bio-recognition tools.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Chemicals and reagents

The 30-mer lysozyme-binding aptamer modified with a primary amino chain at the 5' end (5'-/H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>/ATC AGG GCT AAA GAG TGC AGA GTT ACT TAG-3', with n = 3 or 6, further called 3Apt and 6Apt, respectively) was synthesized and HPLC-purified by Eurogentec France (Angers, France). Succinic anhydride, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid (MOPS), 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES), N-tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid (TAPS), acetic acid, tris(hydroxymethyl)aminoethane (TRIS), imidazole, mesityle oxide, tetraethylorthosilicate (TEOS) and 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). 2-(methoxy(polyethyleneoxy)propyl)trimethoxysilane (PEOS) was purchased from Gelest (Morrisville, USA). Standard 1 M NaOH and HCl solutions Normadose were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). All samples, solutions and buffers were prepared using analytical-grade chemicals and ultra-pure water produced by a Direct-Q3 system (Millipore, Molsheim, France).

MOPS buffers (pH ~ 7.2) of various ionic strengths (10, 50 and 100 mM, respectively) were composed of MOPS (15.6, 75.6 and 149.5 mM, respectively) and NaOH (10, 50 and 100 mM, respectively). 10 mM MOPS buffers of various pH values (6.60, 7.20 and 7.76 respectively) were composed of MOPS (45.4, 18.9 and 12.2 mM, respectively) and 10 mM NaOH. 10 mM acetate buffers of various pH values (4.19, 4.78 and 5.37, respectively) were composed of acetic acid (42.0, 18.0 and 12.0 mM, respectively) and 10 mM NaOH. 10 mM MES buffers of various pH values (5.42, 6.07 and 6.46, respectively) were composed of MES (57.7, 19.5 and 13.8 mM, respectively) and 10 mM NaOH. 10 mM TAPS buffers of various pH values (7.87, 8.41 and 8.86, respectively) were composed of TAPS (38.1, 18.9 and 12.8 mM, respectively) and 10 mM NaOH. 10 mM imidazole buffer (pH 7.65) was composed of 38.1 mM imidazole and 10.0 mM HCl. 10 mM Tris buffer (pH 7.80) was composed of 14.7 mM Tris and 10.0 mM HCl. Mesityle oxide at 0.05% v/v in the separation electrolyte was used as a neutral marker for EOF measurement.

## 2.2 Synthesis of maghemite silica core shell nanoparticles (NP-COOH, NP\*-COOH)

Magnetic maghemite nanoparticles ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , 7 nm in mean physical diameter) were prepared following the procedure described by Massart [44] and were subsequently coated by citrate anions [45]. A first silica shell was prepared in an ethanolic medium in the presence of ammonia by condensation of tetraethoxysilane (TEOS) [46]. For the preparation of NP\*-COOH, the rhodamine dye bearing an isothiocyanate functional group (RITC) was previously coupled to the amino group of a silica amino derived compound, 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS) through an addition reaction. The APTS, either labelled or not, was then incorporated within the silica first shell by co-hydrolyzing with TEOS. The silica shell functionalization was achieved through a second step by simultaneous condensation of both APTS and a silica PEG derived compound, PEOS, (molar ratio APTS/PEOS = 1), with a given amount of TEOS (molar ratio TEOS/APTS = 8) in order to generate a crosslinked silica shell [17, 47, 48]. This synthesis led to colloidally stable maghemite silica core shell nanoparticles with a 35 nm mean physical diameter measured by TEM, a 38 nm mean hydrodynamic diameter measured by DLS and a positive zeta potential, +13 mV, at pH 7.4. The relative amine coverage (0.85 amine per  $\text{nm}^2$ ) was estimated with the ninhydrine colorimetric assay as it was previously described [17, 45]. The amine-modified particles could be easily converted to carboxylic acid-modified nanoparticles via overnight reaction with 100 equivalents (relative to the amine function quantity) of succinic anhydride in MOPS buffer (100 mM, pH 7.4). The mixture was then purified with a PD-10 desalting column (Sigma-Aldrich) equilibrated with MOPS buffer (100 mM, pH 7.4) to remove the excess of succinic anhydride. This chemical modification led to colloidally stable carboxylic acid-modified maghemite silica core shell nanoparticles (NP-COOH and NP\*-COOH) with a 35 nm mean physical diameter measured by TEM, a 47.5 nm mean hydrodynamic diameter measured by DLS and a negative zeta potential (-24 mV and -22 mV for NP\*-COOH and NP-COOH at pH 7.4, respectively). Although the quantity of carboxylic acid function was not determined by employing 100 equivalents of succinic anhydride relative to the amine function quantity, one can assume that all the amino functions were converted into carboxylic acid functions. Thus we will consider that the quantity of carboxylic acid groups is equal to the quantity of amino groups of the starting nanoparticles.

### 2.3 Grafting procedure (NP-3Apt, NP\*-6Apt)

Aptamers were grafted onto the carboxylic acid-modified maghemite silica core shell nanoparticles (either NP-COOH or NP\*-COOH) using activation with a carbodiimide (EDC). 15 mg EDC (100 equivalents relative to the theoretical carboxylic function quantity) were dissolved in 500  $\mu\text{L}$  MOPS buffer (100 mM, pH 7.4). 500  $\mu\text{L}$  carboxylic acid-modified maghemite silica core shell nanoparticles solution ( $2.3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} \text{ COOH}$ ) was added to the previous mixture and the reaction mixture was incubated for 30 min. Finally, a known quantity (300 equivalents relatively to the theoretical carboxylic function quantity) of amino-modified aptamer with a C3 or C6 linker chain (3Apt and 6Apt, respectively) diluted in MOPS buffer (100 mM, pH 7.4) was added to the NP-COOH and NP\*-COOH solutions, respectively, and the mixture was incubated 12h at 4°C. Aptamer-functionalized nanoparticles (NP-3Apt and NP\*-6Apt, respectively) and non grafted aptamers were separated by 3 cycles of centrifugation (15000 G). The washing solutions were stocked for aptamer grafting rate determination. Aptamer-functionalized nanoparticles were dispersed in MOPS buffer (100 mM, pH 7.4) and stocked at 4°C. The mean hydrodynamic diameters of these grafted NPs (NP-3Apt and NP\*-6Apt) was determined as 49 nm by DLS measurement.

### 2.4 CE apparatus and measurements

Electrophoretic measurements were performed with an HP<sup>3D</sup>CE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector. Data were handled by an HP Chemstation software. Bare fused-silica capillaries of 50  $\mu\text{m}$  i.d. (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) with effective length of 8.5 cm and total length of 35.0 cm were used. For CZE measurements, successive hydrodynamic injections were performed in the following order: neutral marker (30 mbar, 3 s), background electrolyte (BGE) (30 mbar, 2 s), sample (30 mbar, 3 s), BGE (30 mbar, 2 s). For FACCE measurements, the sample was introduced continuously by electrokinetic injection. Separations were performed under a 10 kV positive voltage (electric field, 285 V/cm) and the temperature of the capillary cartridge was set at 25°C unless otherwise specified. The detection wavelengths were 254 nm and 200 / 254 nm for EOF marker and NPs, respectively. Injections were repeated ( $n = 3$ ) to check the precision of the data.

Prior to first use, bare fused-silica capillaries were activated by successive rinsing with 1 M NaOH for 15 min followed by 0.1 M NaOH and ultrapure water for 10 min each under 925 mbar. Between each run, the capillary was rinsed with BGE for 3 min under the

aforementioned pressure. When not in use, the capillaries were rinsed with ultrapure water for 10 min and dried with air for 5 min, always under the aforementioned pressure.

Given the four successive steps of the injection protocol for CZE measurements, the corrected migration lengths to detector for the neutral marker and the sample,  $l_{corr}^{NM}$  and  $l_{corr}^{NP}$ , were calculated as follows [49] (Equations 1 and 2):

$$l_{corr}^{NM} = 1 - (l_2 + l_3 + l_4) - 0.5l_1 \quad (1)$$

$$l_{corr}^{NP} = 1 - l_4 - 0.5l_3 \quad (2)$$

where  $l_1$  through  $l_4$  stand for the zone lengths corresponding to the four hydrodynamic injection steps, numbered in the order of introduction. These lengths were calculated according to Hagen-Poiseuille law (Equation 3):

$$l_i = \frac{d_c^2 P_0 t_0}{32\eta L} \quad i = 1:4 \quad (3)$$

where  $d_c$ ,  $L$ ,  $P_0$ ,  $t_0$ , and  $\eta$  are the inner diameter and full length of the capillary, the injection pressure, the duration of pressure application, and the viscosity of the separation electrolyte, respectively.

## 2.5 UV measurements

The washing solutions were purified by 3 supplementary cycles of centrifugation in order to eliminate residual nanoparticles. The absorbance was then measured by UV spectroscopy at 254 nm using a Secomam Uvikon XL (Ales, France) and the concentration of non grafted aptamers was calculated using Beer-Lambert's law.

## 2.6 Nanoparticles characterization

The mean physical diameter of nanoparticles was characterized by microscopic electronic transmission using a JEOL 100CX (Tokyo, Japan). The mean hydrodynamic diameter of nanoparticles dispersed in MOPS buffer (100 mM, pH 7.4) was determined by dynamic light scattering using a Malvern zetasizer NanoZS model (Orsay, France). The zeta potential of nanoparticles dispersed in MOPS buffer (100 mM, pH 7.4) was measured using the same instrument.

### 3 Results and discussion

Four types of NPs were characterized by CZE: (i) non-grafted maghemite / silica core-shell NPs functionalized with polyethylene glycol (PEG) chains of 4 to 6 units and carboxylic acid groups grafted on a 8 carbons chain tails (called NP-COOH); (ii) non-grafted maghemite / silica core-shell NPs functionalized with the same polyethylene glycol (PEG) and carboxylic acid groups, and containing a fluorescent dye, rhodamine, in the inner silica shell (called NP\*-COOH); (iii) the NP-COOH nanoparticles grafted with a lysozyme-binding aptamer modified with a primary amino chain containing 3 carbon atoms (called NP-3Apt); (iv) the NP\*-COOH nanoparticles grafted with a lysozyme-binding aptamer modified with a primary amino chain containing 6 carbon atoms (called NP\*-6Apt). Dynamic Light Scattering (DLS) analysis allowed the determination of the mean hydrodynamic diameters of these NPs as 47.5 nm and 49 nm for the non-grafted and grafted NPs, respectively. The choice of these four NPs types is related to their further use as bio-recognition tools. Indeed, during the grafting procedure, the length of the primary amino chain (either 3 or 6 carbon atoms) on the aptamer (3Apt and 6Apt respectively), and the introduction of a fluorescent dye in the NP inner silica shell for further fluorescence detection are parameters that could influence the grafting rate on the NPs and the NPs' stability. Furthermore, the non grafted NPs were separated as well in order to help for determining the purity of the grafted NPs.

In a first part, the grafting rate of the aptamer-grafted nanoparticles was determined in order to check the efficiency of the synthesis procedure and estimate the dispersion of the batches. Then, the influence of several parameters, such as pH, ionic strength, counter- and co-ion nature of the BGE, temperature or electric field strength, on the nanoparticles' behaviour was evaluated, so as to define their stability conditions in view of their use as probes for bioassays in electrophoretic systems.

#### 3.1 Determination of the grafting rate of the aptamer on the NPs

Briefly, the grafting process consisted in two steps. First, maghemite / silica core-shell NPs functionalized with PEG chains and amino groups were mixed with succinic anhydride in order to create carboxylic acid groups via the formation of an amide bond. Then, the carboxylic acid groups were activated with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) so as to form an amide bond with the primary amino groups of the amino-modified

aptamer molecules (3Apt and 6Apt, i.e. the lysozyme-binding aptamer modified with a primary amino chain (3 or 6 carbon atoms, respectively) at the 5' end).

In a preliminary step, the purity of the two modified aptamers 3Apt and 6Apt was evaluated by CZE in a 100 mM MOPS buffer (pH 7.4) for further aptamer quantitation. The peak of the aptamer modified with a C3 amino chain (3Apt) was splitted in two: an intense peak (peak 1,  $\mu_{ep1} = -26.7 \pm 0.1 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) and a smaller peak with a slightly higher mobility in absolute value (peak 2,  $\mu_{ep2} = -27.3 \pm 0.1 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). These results were compared to the mass spectrum data provided by the supplier, which showed two main signals at 9454,5 m/z (100% relative abundance) and at 9310,8 m/z (15% relative abundance), corresponding to the modified and unmodified aptamer, respectively. Based on the relative proportion of each compound, the peaks observed in CZE were attributed respectively to the amino-modified (peak 1) and unmodified (peak 2) aptamer. The batch provided as the "aptamer 3Apt" was therefore composed of 87% of amino-modified aptamer 3Apt and 13% of unmodified aptamer (Apt), which will have to be taken into account for the determination of the grafting rate. It was furthermore verified that only the amino-modified aptamer 3Apt could be grafted on the NPs, as only the intensity of peak 1 decreased after grafting procedure (results non shown). On the other hand, the aptamer modified with a C6 amino chain (6Apt) presented one unique peak ( $\mu_{ep} = -28.6 \pm 0.1 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), showing the total modification of the aptamer.

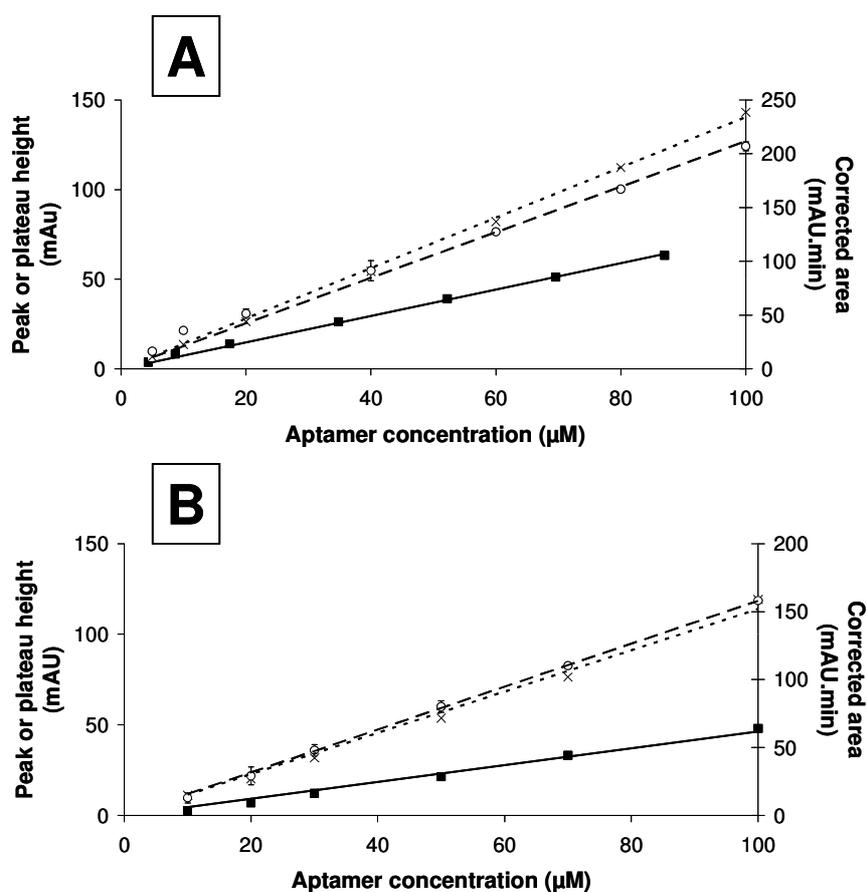
The grafting rate of the aptamer on the NPs was determined by measuring the amount of free aptamer remaining in the supernatant obtained after synthesis by UV absorbance measurements. The free aptamer concentration in the supernatant was determined either by (i) direct determination using the Beer-Lambert's law or (ii) determination using a calibration curve of the aptamer absorbance in function of its concentration.

For direct determination of the grafting rate, the UV absorbance at 254 nm of the free aptamer in the supernatant was measured either with a UV spectrometer (called "direct UV – spectrometer") or with the diode array detector of the CE apparatus using FACCE measurements in a 100 mM MOPS/NaOH buffer (pH 7.4) (called "direct UV – FACCE"). The aptamer concentration was then calculated using Beer-Lambert's law (Equation 4):

$$[\text{Apt}]_f = \frac{A_{254}}{\epsilon_{254} l} \quad (4)$$

where  $[\text{Apt}]_f$  is the concentration of free aptamer in the supernatant,  $A_{254}$  and  $\epsilon_{254}$  are respectively the UV absorbance and the molar extinction coefficient of the modified aptamer

at 254 nm ( $\epsilon_{254} = 308\,300 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , theoretical value given by the supplier Eurogentec France) and  $l$  is the optic path length (i.e. the cuvette width or the inner diameter of the capillary). In spite of the centrifugation step, the supernatant may still contain a few NPs, which absorb around the same wavelength range as the aptamer's one, thus interfering with the determination of its concentration using the direct UV – spectrometer method. The direct UV – FACCE method enabled to diminish this interference, since the supernatant sample was continuously injected under an electric field, which helped to partially separate the free aptamer molecules from the potential remaining NPs. Besides, this method requires smaller volumes of sample.



**Figure 1: Calibration curves obtained from CZE analysis (peak height (■) or corrected area (○)) or FACCE analysis (plateau height (x)) of C3 (A) or C6 (B) amino modified aptamer solutions at various concentrations (5 – 100 µM).** Equations of the least-squares regression straight lines ( $n = 7$ ): (A) - (■)  $y = 0.7375x$ ,  $R^2 = 0.9979$ ; (○)  $y = 1.4051x$ ,  $R^2 = 0.9924$ ; (x)  $y = 2.1162x$ ,  $R^2 = 0.9868$ . (B) - (■)  $y = 0.4644x$ ,  $R^2 = 0.9879$ ; (○)  $y = 1.1395x$ ,  $R^2 = 0.9994$ ; (x)  $y = 1.5793x$ ,  $R^2 = 0.9989$ .

Experimental conditions: 50 µm i.d.x35 cm bare silica capillary (detection length, 8.5 cm). BGE: 100 mM MOPS buffer (pH 7.4). Applied voltage: +10 kV. Temperature: 25°C. Absorbance detection at 254 nm. Hydrodynamic injection: neutral marker (30 mbar, 3 s), BGE (30 mbar, 2 s), sample (30 mbar, 3 s), BGE (30 mbar, 2 s). Sample: 5 - 100 µM 3Apt (A) or 6Apt (B) in BGE.

For the determination of the grafting rate from a calibration curve, solutions of aptamer at various concentrations (5 – 100 µM) were analyzed either by zonal electrophoresis

(CZE) or continuous electrophoretic injection (frontal mode, FACCE) in a 100 mM MOPS buffer (pH 7.4). Calibration curves were obtained by plotting the peak height and the corrected peak area from CZE measurements and the plateau height from FACCE measurements as a function of the aptamer concentration (Figure 1). Concerning the batch of 3Apt, the peak height was plotted against the concentration of modified aptamer (87% of the total concentration) as the two peak apex were differentiated, whereas the corrected area and the plateau height were both plotted against the concentration of total aptamer, given the weak resolution between the two compounds (modified and unmodified aptamer). The supernatant was then injected by CZE and FACCE mode, and the free aptamer concentration was determined using the previous calibration curves.

Knowing the initial quantity of NP ( $1.6 \cdot 10^{14}$  nanoparticles) and modified aptamer ( $1.95 \cdot 10^{-8}$  mol and  $2.15 \cdot 10^{-8}$  mol for 3Apt and 6Apt, respectively) introduced for grafting, the volume of supernatant (1200  $\mu$ L and 1400  $\mu$ L for 3Apt and 6Apt, respectively) and determining the concentration of free aptamer in the supernatant, the grafting rate (number of aptamer on each NP) could be calculated via the different methods (Table 1).

**Table 7: Determination of the grafting rate of the aptamer modified with a primary amino chain containing 3 and 6 carbon atoms (3Apt and 6Apt, respectively), on NP-COOH and NP\*-COOH, respectively.**

**Aptamer 3Apt:**  $n_{\text{Apt}} \text{ initial} = 2.24 \cdot 10^{-8}$  mol (total);  $1.95 \cdot 10^{-8}$  mol (amino-modified)

Method		$n_{\text{Apt}}$ supernatant (nmol)		$n_{\text{Apt}}$ grafted (nmol)		Grafting rate
		Total	Modif.	Total	Modif.	
Direct UV- spectrometer		20.40	10.20	2.00	9.29	34
Direct UV- FACCE		13.68	6.84	8.72	12.65	46
Calibration curves	Peak height		3.42	18.98	16.07	59
	Peak area	12.13	6.06	10.27	13.42	49
	Plateau height	12.48	6.24	9.92	14.25	48
<b>Average</b>						<b>47 <math>\pm</math> 9</b>

**Aptamer C6Apt:**  $n_{\text{Apt}} \text{ initial} = 2.15 \cdot 10^{-8}$  mol

Method		$n_{\text{Apt}}$ supernatant (nmol)	$n_{\text{Apt}}$ grafted (nmol)	Grafting rate
Direct UV - CE		7.84	13.66	50
Calibration curves	Peak height	7.24	14.26	52
	Peak area	13.58	7.92	29
	Plateau height	7.62	13.88	51
<b>Average</b>				<b>46 <math>\pm</math> 11</b>

Concerning NP-3Apt, a higher grafting rate value was determined with the direct-FACCE method compared to the direct UV-spectrometer, which is consistent with the fact that FACCE allows the partial separation between the non-modified, modified free aptamer and NPs before quantitation. This grafting rate value was similar to the ones obtained by peak area

and plateau height measurement in the calibration curve procedure, whereas the peak height measurement with calibration curve provided the higher grafting rate value. This is consistent with the fact that the peak height determination allows a better access to the free aptamer concentration, as previously indicated. Concerning NP\*-6Apt, the different grafting rate determinations were in the same range, except for the peak area determination, which could not be explained.

Considering the calibration curve with peak height determination as the most precise method, the grafting rates for both grafted NPs were in the same range, with a slightly higher value for NP-3Apt (59 and 52 aptamers per NP for NP-3Apt and NP\*-6Apt, respectively). The corresponding surface coverage was 0.0078 and 0.0069 aptamers per nm<sup>2</sup> for NP-3Apt and NP\*-6Apt, respectively. Thus it seems that the length of the linker chain had a small impact on the grafting efficiency.

### **3.2 General electrophoretic behaviour of the non-grafted and grafted NPs**

As will be highlighted in the following paragraphs, some general electrophoretic behaviours were evidenced whatever the experimental conditions.

Concerning the non-grafted nanoparticles, that present an identical hydrodynamic diameter of 47.5 nm (according to DLS measurements), the electrophoretic mobility of the fluorescent ones (NP\*-COOH) was slightly higher (in absolute value) than the one of the non-fluorescent ones (NP-COOH), which could reflect a greater charge density. These results were consistent with zetametry measurements which showed that the zeta-potential of the NP\*-COOH was slightly higher than the one of the NP-COOH (-24 mV and -22 mV at pH 7.4, respectively). One possible explanation could be that the grafting of the carboxylic groups on the amino groups of the NPs was more efficient for the fluorescent NPs than for the non-fluorescent ones.

While grafting the previous NPs with the aptamer molecules, the hydrodynamic diameter was estimated as 49 nm (according to DLS measurements), for both NP-3Apt and NP\*-6Apt, which is slightly higher than the one of both NP-COOH and NP\*-COOH (47.5 nm). As aptamers are rather small polyanions, it could have been expected an increase in charge-to-size ratio and consequently in the electrophoretic mobility (in absolute value). Yet for NP\*-COOH, the grafting of the aptamer modified with a C6-amino chain led to a slight but significant decrease in the electrophoretic mobility (in absolute value), which reflects a

decrease in the charge-to-size ratio. For the NP-COOH, no obvious change of the electrophoretic mobility was observed upon the grafting of the aptamer modified with a C3-amino chain.

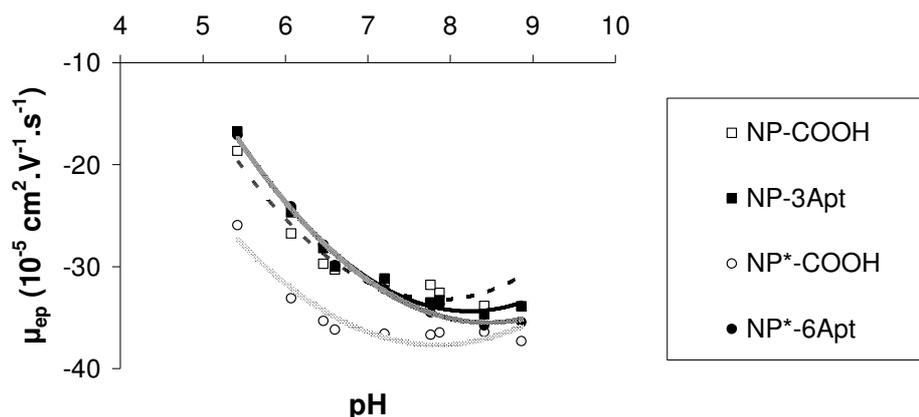
This could be explained by two differences appearing during grafting, i.e. the grafting rates and the amino chain lengths on the aptamer. The NP-3Apt of this study presents the higher grafting rate (59 aptamers per NP) with the shorter amino chain length (three carbons chain) on the aptamer, whereas the NP\*-6Apt present a slightly lower grafting rate (52 aptamers per NP) with the longer amino chain length (six carbon chain). In a previous work, we demonstrated interactions of the lysozyme-binding aptamer with the constituents of different BGEs as possible binary and ternary complexes, that impact on the effective charge of the aptamer and thus on its mobility [50]. Thus the C6 linker which furthermore provides the lower grafting rate, could enable the aptamer molecules to adopt a nucleotidic structure enhancing the interaction with the ions of the BGE that would lead to more charge shielding and thus to a decrease in electrophoretic mobility. This hypothesis will be illustrated while varying the experimental conditions.

### 3.3 Influence of pH

The influence of BGE pH was studied in the range 4.0 to 9.0 using acetate (pKa 4.76 [51]), MES (pKa 6.10 [51]), MOPS (pKa 7.20 [51]) and TAPS (pKa 8.40 [51]) buffers with sodium counter-ions and a 10 mM ionic strength.

When the buffer pH increased, the electroosmotic mobility increased, due to the increasing deprotonation of the silanol groups of the capillary wall, and the electrophoretic mobility of all NPs increased (in absolute value) (Figure 2), which could be attributed to an increase in the deprotonation of the acidic groups (either the carboxylic acid functions of the NPs or the phosphate groups of the aptamer) leading to an increase in the effective charge of the NPs. The evolution was quite continuous for all sulfonate-based buffers (MES, MOPS and TAPS), but a discontinuity was observed between acetate and MES buffer: in acetate pH 5.37, the electrophoretic mobility was 20 to 40% higher (in absolute value) than in MES pH 5.42 (results not shown, for simplification of Figure 2). Since Na<sup>+</sup> is introduced at the same concentration, this discrepancy obviously reflects an effect of the buffer's co-ion on the electrophoretic mobility of the NPs. Indeed, acetate is anionic, whereas MES, MOPS and TAPS are zwitterionic sulfonate-based ions and could thus induce more shielding of the negative charges of the NPs. This was already demonstrated in our previous work concerning

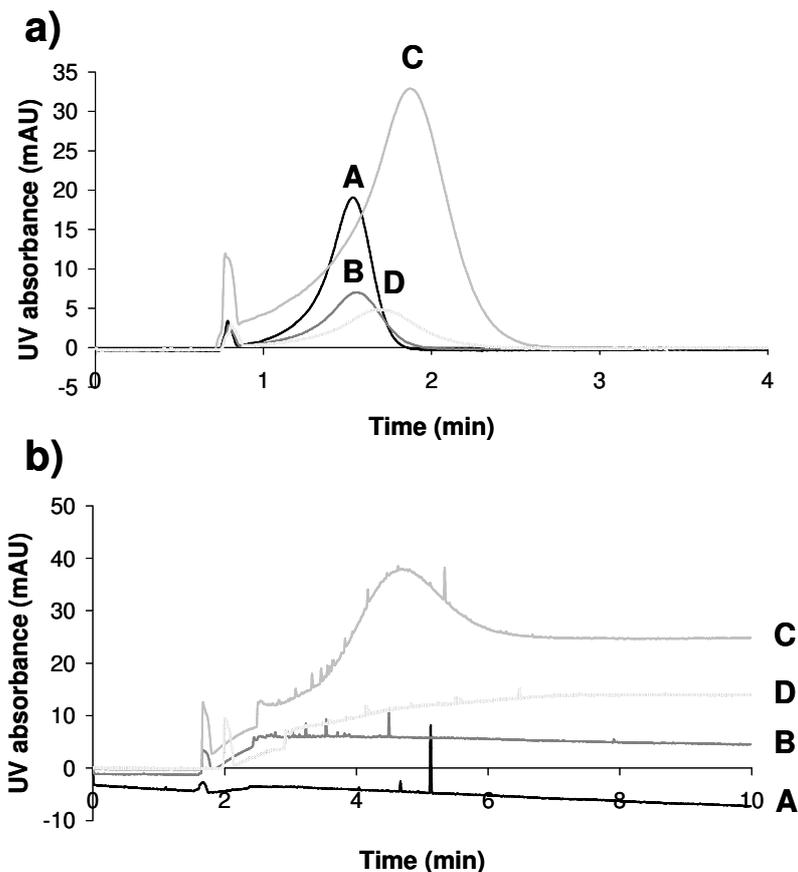
interaction of BGE components with aptamers, with the case of MOPS buffer [50], as it presents positively charged amino groups that could interact with the negatively charged phosphate groups of the aptamer to form a binary complex. Moreover, in acetate buffer, the increase in electrophoretic mobility is more important for the grafted NPs (38% and 35% for NP-3Apt and NP\*-6Apt, respectively) than for the non-grafted one (33% and 21% for NP-COOH and NP\*-COOH, respectively), which could reflect a change in the tridimensionnal structure of the grafted NPs due to the chaotropic character of acetate.



**Figure 2: Experimental and modeled variation of the electrophoretic mobility of NPs as a function of pH.** Experimental conditions: 50  $\mu\text{m}$  i.d.x35 cm bare silica capillary (detection length, 8.5 cm). Background electrolyte: acetate, MES, MOPS and TAPS buffers with sodium counter-ions, at 10 mM ionic strength and various pH (see section 2.1). Applied voltage: +10 kV. Temperature: 25°C. Absorbance detection at 200/254 nm. Hydrodynamic injection: neutral marker (30 mbar, 3 s), BGE (30 mbar, 2 s), sample (30 mbar, 3 s), BGE (30 mbar, 2 s). Sample: pure solution of NPs dispersed in MOPS buffer (100 mM, pH 7.4).

Figure 3 presents the electrophoretic profiles of the four types of NPs at two different pH values. At pH values above 5.4, the electrophoretic profiles are representative of stable, quite homogeneous batches. The peak height corresponding to each NP varies according to the concentration of the pure sample. At pH 5.4, a positive shift of the background signal was observed after the detection of the NPs' peak, indicating possible adsorption phenomenon on the capillary wall. At pH lower than 5 (acetate buffer pH 4.8 and pH 4.2) and under a positive voltage, only one peak was detected, which was identified as the neutral marker (except for the profile C in Fig. 3). No signal was detected when a negative polarity was applied. This means that the net charge of the NPs was close to zero, leading to co-migration with the neutral marker. In addition, the electrophoretic profiles showed some "spikes" that were not observed in buffers of higher pH, which could indicate the beginning of an aggregation phenomenon (Figure 3B) [24]; indeed, as the particles seem quasi-neutral, there is no more electrostatic repulsion between them and thus they can gather into aggregates. Indeed, it has

been shown that the formation of aggregates leads to spiky profiles in CE, even before it can be observed with naked-eye [24].



**Figure 3: electropherograms obtained upon injection of NP-COOH (A), NP-3Apt (B), NP\*-COOH (C) and NP\*-6Apt (D) in 10 mM MOPS buffer (pH 7.2) (a) or 10 mM acetate buffer (pH 4,8) (b).**

Experimental conditions: see Fig 2 except for: Background electrolyte: 10 mM MOPS (pH 7.2) (a) or acetate (pH 4.8) (b) with sodium counter-ions. Sample: pure solution of NPs dispersed in MOPS buffer (100 mM, pH 7.4) at various concentrations.

An attempt to modelize the variations of the electrophoretic mobility in function of pH was achieved by fitting the experimental curves with quadratic functions of the following form (Equation 5):

$$\mu_{ep} = a \times pH^2 + b \times pH + c \quad (5)$$

The data corresponding to acetate buffer were not considered here. The resulting curve can be seen in Figure 2. An estimation of the point of zero charge (PZC) of each NP was then calculated by resolving the quadratic equations. The results are gathered in Table 2. The estimated PZCs were all in the 3.2 to 4.2 range, which is in good agreement with the fact that the NPs become quasi-neutral at pH lower than 5.

Concerning the non-grafted nanoparticles, the PZC of the fluorescent NPs was slightly smaller than the one of the non-fluorescent NPs (3.23 and 4.05 for NP\*-COOH and NP-

COOH, respectively), which could reflect a greater charge density: indeed if there are more negatively charged groups, the neutralization should be reached for lower pH. These results were consistent with zetametry measurements, which showed that the zeta-potential of the NP\*-COOH was slightly higher than the zeta-potential of the NP-COOH (-24 mV and -22 mV in 100 mM MOPS (pH 7.4), respectively). This gives strength to the hypothesis that the grafting of the carboxylic groups on the amino groups of the NPs was more efficient for the fluorescent NPs than for the non-fluorescent ones. These results explain the visualization of a peak for NP\*-COOH on Fig. 3B as it presents the lower PZC.

**Table 2: Estimation of the point of zero charge (PZC) of the NPs through modelization of the influence of pH on the electrophoretic mobility by quadratic functions.** Experimental conditions : see Figure 2.

Type of NP	a	b	c	R <sup>2</sup>	PZC
NP-COOH	2.2894	-35.983	108.16	0.9525	4.05
NP-3Apt	2.1477	-35.342	111.02	0.9832	4.23
NP*-COOH	1.7691	-27.755	71.182	0.8966	3.23
NP*-6Apt	1.9704	-33.302	105.24	0.9908	4.21

The PZC was higher for the grafted NPs than for the non-grafted ones, which reflects a decrease in the effective net charge of the NPs after grafting, as already discussed, i.e. the fact that aptamers interact with the buffer ions, that leads to charge shielding. Furthermore, the shift between non-grafted and grafted NPs is higher for NP\*-6Apt and NP\*-COOH ( $\Delta = 0.98$ ) than for NP-3Apt and NP-COOH ( $\Delta = 0.18$ ), giving rise to quite similar PZC for the two grafted NPs types (4.23 and 4.21 for NP-3Apt and NP\*-6Apt, respectively). As the grafting rate was nearly the same for both NPs, a possible explanation may be the difference of linker chain length between the two amino-modified aptamers, as already discussed: the C6-amino modified aptamer has a longer linker chain, which could lead to increased flexibility and better ability to shield the negative charges of the free carboxylic groups, thus decreasing the effective net charge of the NP.

The electrophoretic dispersion at half height ( $\Delta\mu_{ep}$  of the NPs' electrophoretic profiles globally decreased from  $10 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  to  $8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  and from  $8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  to  $6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  for grafted and non-grafted NPs, respectively, while varying the pH from 9 to 5.5. This seems to indicate that sample dispersion is both due to the grafting procedure and the charge density brought by the aptamer, and to the NPs themselves.

Thus, pH seems to be an important parameter for both separation and stability of the NPs. Between pH 5 and pH 9, the NPs were stable and their electrophoretic mobility

gradually increased in absolute value while increasing pH. For pH lower than 5, the NPs' net effective charge was close to zero, which led to some aggregation.

### 3.4 Influence of ionic strength

The influence of BGE's ionic strength on non-grafted and grafted NPs electrophoretic behaviour was studied. A set of three MOPS buffers with ionic strength (IS) of 10 mM (pH 7.25), 50 mM (pH 6.90) and 100 mM (pH 7.40) was employed for the analysis of the four types of NPs and subsequently their mixture. In order to take into account the slight variation of pH between the BGEs, the corresponding theoretical electrophoretic mobilities at 10 mM ionic strength (Table 3, values indicated between brackets) were calculated by using the model previously described (Equation 5 and Table 2). Interestingly enough, the electrophoretic profiles of the NPs were not altered when the ionic strength was increased till 100 mM, which seems to indicate that no aggregation occurred.

Increasing the ionic strength led to decreasing both electroosmotic and NPs' effective mobility (in absolute value) (Table 3), which corresponds to capillary and NPs surfaces charge and zeta-potential decreases, respectively, due to a progressive screening of the surface charge by counterions of increasing concentration. The variation of electrophoretic mobilities due to pH differences is very slight (3-8%, theoretical values) compared to the global variation (30-50%, experimental values), indicating that the mobility evolution was mainly due to ionic strength variations.

**Table 3: Experimental electroosmotic mobility, electrophoretic mobilities (in absolute value) and peak dispersion at half height ( $\Delta\mu_{ep}$ ) of grafted and non-grafted NPs in MOPS buffers of various ionic strengths ( $n = 3$ ). Theoretical electrophoretic mobilities in 10 mM ionic strength at the three pH values were calculated using the model (Equation 5 and Table 2), and are indicated between brackets. Experimental conditions: see Fig. 2 except for background electrolyte: MOPS/NaOH 10, 50 or 100 mM (pH 7.25, 6.90 and 7.40, respectively).**

Ionic strength	pH	EOF	NP-COOH		NP*-COOH		NP-3Apt		NP*-6Apt	
			$\mu_{ep}$	$\Delta\mu_{ep}$	$\mu_{ep}$	$\Delta\mu_{ep}$	$\mu_{ep}$	$\Delta\mu_{ep}$	$\mu_{ep}$	$\Delta\mu_{ep}$
10 mM	7.25	$79.3 \pm 3.8$	$34.2 \pm 1.6$ (32.4)	$9.0 \pm 1.2$	$37.2 \pm 0.1$ (32.3)	$9.1 \pm 0.4$	$34.0 \pm 0.5$ (37.1)	$9.2 \pm 2.1$	$34.1 \pm 0.8$ (32.6)	$10.7 \pm 0.4$
50 mM	6.90	$50.9 \pm 1.1$	$26.2 \pm 1.5$ (31.1)	$4.8 \pm 0.5$	$31.5 \pm 0.7$ (30.6)	$3.4 \pm 0.3$	$26.1 \pm 1.5$ (36.1)	$5.1 \pm 0.3$	$24.0 \pm 0.6$ (30.7)	$4.3 \pm 0.3$
100 mM	7.40	$37.0 \pm 0.2$	$20.3 \pm 0.6$ (32.7)	$1.8 \pm 0.3$	$25.8 \pm 0.0$ (32.9)	$1.9 \pm 0.0$	$20.2 \pm 0.6$ (37.3)	$1.7 \pm 0.2$	$17.7 \pm 0.1$ (33.3)	$3.1 \pm 0.4$

As it was previously described, for a given ionic strength the electrophoretic mobility of NP\*-COOH was slightly higher (in absolute value) than the electrophoretic mobility of NP-COOH, whereas the mobility decrease was a little less important (-30% and -40%

between 10 and 100 mM for NP\*-COOH and NP-COOH, respectively). At 10 mM ionic strength, the grafted NPs had the same electrophoretic mobility; yet the decrease in mobility due to the increase in ionic strength from 10 to 100 mM was slightly more important for NP\*-6Apt (-48% and -40% for NP\*-6Apt and NP-3Apt, respectively). As it was previously discussed, this may be explained by a greater ability of the C6-aptamer to interact with counterions (i.e. Na<sup>+</sup> cations and MOPS zwitterions), leading to a more important charge screening.

The separation of the mixture of fluorescent and non-fluorescent grafted NPs (NP-3Apt and NP\*-6Apt) was achieved for an ionic strength superior to 50 mM. A poor separation of the grafted and non-grafted NP\*-COOH and NP\*-6Apt occurred at 10 mM IS, whereas a greater separation appeared for higher IS (50 and 100 mM). No separation of the grafted and non-grafted NP-COOH and NP-3Apt was observed, whatever the IS.

Finally, the electrophoretic peak dispersion of all NPs increased while decreasing the ionic strength (Table 3), which may be attributed to (i) the difference in ionic strength and pH between the sample (diluted in 100 mM MOPS, pH 7.4) and the BGE, leading to peak enlargement and (ii) the increasing ion charge shielding while increasing BGE concentration.

In conclusion, no sign of aggregation was observed in the 10 – 100 mM ionic strength range, which indicated that both non-grafted and grafted NPs were stable in this range. Furthermore, ionic strength impacts on the charge density of the grafted nanoparticles, with an important effect of the amino chain length of the aptamer. Finally, the purity of the batches could only be checked for NP\*-6Apt.

### 3.5 Influence of temperature

The electrophoretic mobility of analytes is affected by temperature mainly due to viscosity modification, but also to zeta - potential variation [52]. Indeed, it is known that the magnitude of zeta-potential increases, generally linearly, with temperature [53]. Moreover, temperature can modify physico-chemical equilibriums and the structure of DNA [54]. The effect of separation temperature on the electrophoretic behaviour of the four NPs was then studied in the 15 – 60°C range, in a MOPS buffer (pH 7.25). The ionic strength was set at 10 mM, which provided short analysis times. The viscosity was measured at each temperature according to the protocol previously developed [55], using ethylene glycol for the system calibration ( $\eta = 16.1 \times 10^{-3}$  Pa.s at 25°C). The corrected mobilities  $\mu_{ep\ cor}(T)$  were calculated according to the following equation (Eq. 6):

$$\mu_{ep\,cor}(T) = \frac{\eta_T}{\eta_{25}} \mu_{ep}(T) \quad (6)$$

where  $\eta_T$  and  $\eta_{25}$  are the viscosities of the buffer measured at T (°C) and 25°C, respectively, and  $\mu_{ep}(T)$  is the electrophoretic mobility determined from the migration time. The electroosmotic mobilities were also corrected using the same equation.

No change in NPs electrophoretic profiles was observed, which indicated that the particles either non-grafted or grafted were stable in this temperature range, with no sign of destabilization being noticed. Yet, the correction for viscosity did not lead to a constant value of the mean effective mobility over this temperature range: the corrected electrophoretic mobility of all NPs increased (in absolute value) rather linearly when temperature increased. The increase was slightly higher for the grafted NPs than for the non-grafted ones: between 15 and 60°C, there was a 13-14% increase for the non-grafted NPs (13.8% and 13.4% for NP-COOH and NP\*-COOH, respectively) and a 15-18% increase for the grafted NPs (15.2% and 17.7% for NP-3Apt and NP\*-6Apt). Thus, temperature seems to have an appreciable effect on zeta-potential and probably a slight one on aptamer configuration as well. Concerning the electrophoretic peak dispersion at half height, surprisingly, corrected peak dispersion (from viscosity) increased by 15 % for NP-COOH and by 30 % for NP-3Apt when temperature increased from 15 to 60°C. On the contrary, corrected peak dispersion (from viscosity) decreased by 20 % for NP\*-COOH and by 15 % for NP\*-6Apt when temperature increased from 15 to 60°C. This phenomenon could be connected with the longer C6 linker on the aptamer, that could lead to a specific nucleotidic structure.

The choice and stability control of temperature seems therefore important for further use of these bio-recognition tools, considering that the NPs form stable colloidal suspensions in the 15 – 60°C temperature range.

### 3.6 Influence of BGE counter-ion

For the non grafted NPs and the NPs grafted with aptamers, the counter-ion nature could have an effect on the charge density of the NPs and on the charge density, structure, and recognition properties of aptamers, and therefore on the electrophoretic behaviour of the aptamer-grafted NPs.

In order to highlight the influence of the counterion, separations of the fluorescent NPs were performed in three different BGEs (10 mM ionic strength) with counterions of varying size: MOPS (pH 7.25) (sodium counterion, M = 14 g/mol; MOPS zwitterion, M = 209.3

g/mol); imidazole (pH 7.65) (imidazole counterion,  $M = 68$  g/mol) and Tris (pH 7.80) (Tris counterion,  $M = 121$  g/mol). The experimental electroosmotic and electrophoretic mobilities of the fluorescent NPs at 25°C in the three different BGEs are gathered in Table 4. The theoretical electrophoretic mobilities in 10 mM MOPS according to the BGE pH were also calculated using the model (Equation 5 and Table 2).

**Table 4: Corrected electroosmotic mobilities, electrophoretic mobilities and peak dispersion at half height ( $\Delta\mu_{ep}$ ) of the fluorescent NPs at 25°C in BGEs of different counter-ions (10 mM ionic strength).** Theoretical electrophoretic mobilities in 10 mM MOPS at the three pH values were calculated using the model (Equation 5 and Table 2), and are indicated between brackets.

Experimental conditions: see Fig. 2 except for background electrolyte: 10 mM MOPS (pH 7.25), imidazole (pH 7.65) or Tris (pH 7.80).

BGE	$\mu_{eo}$ ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\mu_{ep} \text{ NP}^* \text{-COOH}$ ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\Delta\mu_{ep} \text{ NP}^* \text{-COOH}$ ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\mu_{ep} \text{ NP}^* \text{-6Apt}$ ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$\Delta\mu_{ep} \text{ NP}^* \text{-6Apt}$ ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )
<i>MOPS/NaOH,</i> <i>pH 7.25</i>	$57.9 \pm 0.0$	$-34.8 \pm 0.2$ (-37.1)	$6.5 \pm 0.1$	$-30.3 \pm 0.3$ (-32.6)	$6.8 \pm 0.1$
<i>Imidazole/HCl,</i> <i>pH 7.65</i>	$56.5 \pm 0.9$	$-24.6 \pm 1.3$ (-37.6)	$2.1 \pm 0.1$	$-23.6 \pm 3.4$ (-34.2)	$2.5 \pm 0.4$
<i>Tris/HCl,</i> <i>pH 7.80</i>	$69.2 \pm 0.9$	$-43.6 \pm 0.6$ (-37.7)	$1.1 \pm 0.0$	$-44.1 \pm 0.2$ (-34.6)	$0.4 \pm 0.0$

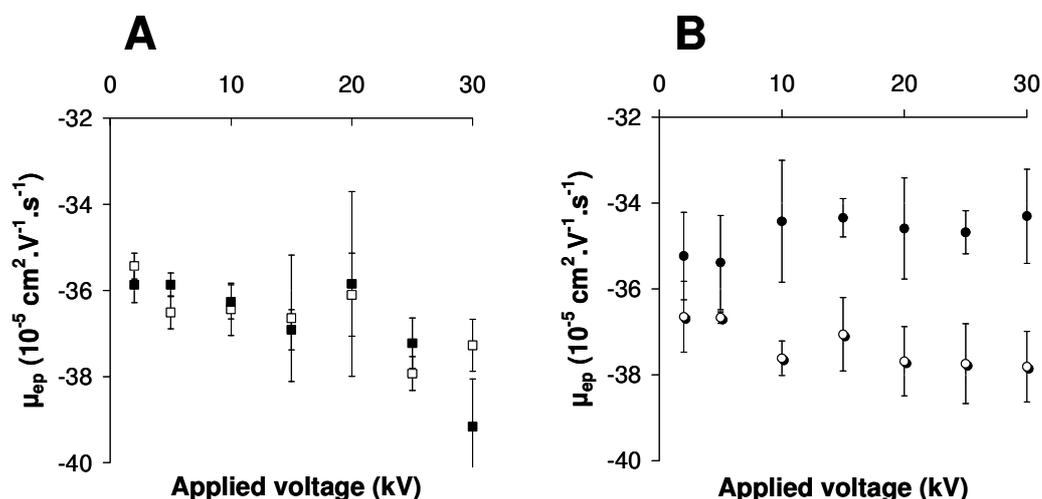
Results indicate that, at the same ionic strength, electroosmotic and electrophoretic mobilities of both non-grafted and grafted NPs decrease in BGEs from Tris to MOPS to Imidazole. This evolution is not due to the changes in BGE pH, as shown by the virtually constant theoretical mobilities. This could be explained by the counterion condensation (CC) phenomenon: indeed, at neutral pH the NPs have multiple negative charges brought by the deprotonated carboxylic acid groups on their surface for both NPs, and by the additional deprotonated phosphate groups of the aptamer chain for the grafted NPs. Due to their high charge density, the NPs are surrounded by an electrostatic field which “traps” the cationic species present in the buffer through a phenomenon known as “ion-binding” or “counterion condensation” [56]. According to Manning’s CC theory, this electrostatic interaction leads to a decrease of the effective charge of the NPs [57, 58], and thus of their electrophoretic mobility. In MOPS buffer, not only sodium but also MOPS zwitterion can act as counter-ions for aptamers, as demonstrated previously [50]. Thus, the decrease in mobility can be related to the decrease in counter-ion size (considering the interaction of both sodium and MOPS zwitterions in the case of MOPS buffer). A possible explanation is that, due to the increase in counterion size, steric hindrance occurs when it interacts with the negative groups of the NPs, leading to less CC.

Concerning peak dispersion at half height, the values are smaller in Tris buffer, than in imidazole and than in MOPS. This can not be directly related to the pH slight evolution as it was demonstrated that peak dispersion was decreasing with pH. The much higher value for separations in MOPS buffer could be due to the fact that two counter-ions are present in this buffer (sodium cation and MOPS zwitterion).

As a complementary study, the influence of temperature on the electrophoretic mobility of the fluorescent NPs in the three BGEs was studied (results not shown). The evolution observed in Tris buffer was roughly the same as in MOPS buffer, that is to say a rather linear increase of the corrected electrophoretic mobility (in absolute value) with the temperature. However, in imidazole buffer, the corrected mobility could be considered approximately constant given the accuracy of the measurement. This could be again correlated to a higher steric hindrance for the larger counter-ions.

### 3.7 Influence of electric field strength

The effect of the electric field strength on the electrophoretic mobility of the NPs was evaluated using positive separation voltages of 2, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 kV (corresponding electric field strengths of 57.1, 142.9, 285.7, 428.6, 571.4, 714.3 and 857.1  $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ , respectively) in a 10 mM ionic strength MOPS buffer (pH 7.25). Figure 4 presents the evolution obtained for the four types of NPs.



**Figure 4:** Variation of the electrophoretic mobility of the non fluorescent (A) and fluorescent NPs (B), either grafted (black symbols) or non-grafted (open symbols) in function of the voltage applied for separation. Experimental conditions: see fig. 2 except for background electrolyte: 10 mM MOPS (pH 7.25).

Firstly, the electrophoretic profiles of all NPs showed that no aggregation phenomenon in this electric field range occurred. A very slight increase (in absolute value) in the

electrophoretic mobility of the NPs (around +3-7% between 2 and 30 kV) was observed while increasing the electric field, except for the grafted fluorescent NPs (NP\*-6Apt), which mobility slightly decreased (-2.5% between 2 and 30 kV). These observations were not attributed to a destabilization of the colloidal suspension, since the formation of aggregates may more probably lead to a decrease of electrophoretic mobilities by slowing down the migration of compounds into the capillary. The increase in mobility (in absolute value) could be due to an increase in the net charge caused by counterion dissociation, whereas the decrease of the mobility of the NP\*-6Apt may be the consequence of a nucleotic structural change, as already discussed. Anyway, these variations might not be significant enough since they were very close to the accuracy of the measurement (RSD around 2%).

These experiments indicate that the use of these bio-recognition tools is possible in electrophoretic separations while applying electric fields ranging from 50 to 900 V.cm<sup>-1</sup>.

## 4 Concluding remarks

In this work, the characterization of four types of maghemite / silica core-shell NPs either non-grafted or grafted with a lysozyme-binding aptamer of different primary amino chains by capillary zone electrophoresis (CZE) was performed. The grafting rate, determined by CE instrumentation, was around 50/60 aptamers per NP for both types of grafted NPs, showing that the length of the linker chain and the nature of the silica shell had a slight impact on the grafting efficiency. Thus, it seemed that the structure of the aptamer-grafted NPs partially relied on the synthesis parameters and notably on the length of the amino chain of the aptamer.

In a second step, the influence of ionic strength, temperature, electric field strength, buffer pH and nature on the electrophoretic behaviour, stability and peak dispersion at half height of the NPs submitted to an electric field was estimated. pH seems to be an important parameter for both separation and stability of the NPs. In the 5 – 9 pH range, the NPs were stable and their electrophoretic mobility gradually decreased in absolute value with decreasing pH. For pH lower than 5, the NPs' net effective charge was close to zero, which led to some aggregation. Temperature seems to have an appreciable effect on zeta-potential and probably a slight one on aptamer configuration as well. Electric field strength seemed to have no significant effect on the electrophoretic mobilities and profiles of all NPs in the 50- 900 V.cm<sup>-1</sup> range. No sign of aggregation was observed on the electrophoretic profiles in the 10 – 100 mM ionic strength range and in the 15 – 60°C temperature range, indicating that either non-grafted or grafted NPs were stable under these conditions. Finally, we evidenced an influence of the buffer nature on the electrophoretic mobility and peak dispersion of the NPs, which could depend on the grafting procedure, and be explained by different counter-ion sizes leading to different steric hindrance, and different aptamer structures leading to different interaction sites.

These results indicate that aptamer-grafted NPs can be employed as bio-recognition tools in systems using an electrophoretic format. Such study will furthermore help to determine the grafting rate and the optimal conditions to study the interaction of these bio-recognition tools with their targets. Work is in progress to prove the high affinity of these grafted aptamers with their target, and the influence of separation electrolyte on this affinity.

### 1.3. Conclusion

Dans cette étude, quatre types de NPs maghémite/silice cœur/coquille, fonctionnalisées ou non par un aptamère anti-lysozyme modifié par une chaîne aminée de longueur variable, ont été caractérisées par électrophorèse capillaire de zone (CZE). Le taux de greffage, déterminé à l'aide de l'appareillage de CE, est de 50/60 aptamères par NP pour les deux types de NPs greffées, ce qui montre que la longueur de la chaîne aminée ainsi que la nature de la coque de silice ont peu d'influence sur l'efficacité du greffage. Il semble en outre que la structure des NPs fonctionnalisées par l'aptamère dépende partiellement des paramètres de synthèse et notamment de la longueur de la chaîne aminée de l'aptamère.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence de la force ionique, de la température, du champ électrique, du pH et de la nature du tampon sur le comportement électrophorétique, la stabilité et la dispersion électrophorétique des NPs soumises à un champ électrique. Le pH apparaît comme un paramètre important à la fois pour la séparation et la stabilité des NPs. Dans la gamme de pH 5 – 9, les NPs sont stables et leur mobilité électrophorétique décroît progressivement (en valeur absolue) lorsque le pH diminue. Pour un pH inférieur à 5, la charge nette effective des NPs est quasi nulle, ce qui conduit à la formation d'agrégats. La température semble également avoir un effet notable sur le potentiel zéta et probablement sur la conformation de l'aptamère. En revanche, le champ électrique n'influence pas de façon significative les mobilités et les profils électrophorétiques des NPs dans la gamme 50- 900 V.cm<sup>-1</sup>. Les profils électrophorétiques ne présentent aucun signe d'agrégation sur la gamme de force ionique 10 – 100 mM ainsi que sur la gamme de température 15 – 60°C, ce qui reflète la stabilité des NPs greffées et non greffées dans ces conditions. Enfin, nous avons mis en évidence l'influence de la nature du tampon sur la mobilité et la dispersion électrophorétique des NPs, ce qui pourrait s'expliquer par la différence de taille des contre-ions, influant sur l'encombrement stérique et la structure de l'aptamère greffé.

Ces résultats montrent que les NPs fonctionnalisées par des aptamères peuvent être employées comme outils de bio-reconnaissance dans des systèmes électrophorétiques. Cette étude a également permis de déterminer le taux de greffage et les conditions opératoires optimales pour l'étude de l'interaction de ces objets avec leur cible. La suite de ce travail consistera à évaluer l'affinité des aptamères greffés pour leur cible.

## 2. Caractérisation de l'affinité de nanoparticules fonctionnalisées par l'aptamère anti-lysozyme

Après avoir montré la faisabilité de la fonctionnalisation de nanoparticules magnétiques cœur / coquille par l'aptamère et caractérisé par électrophorèse capillaire de zone (CZE) les objets obtenus en termes de taux de greffage, de comportement électrophorétique et de stabilité colloïdale, nous avons étudié l'interaction entre l'aptamère greffé et sa cible, le lysozyme, afin de mettre en lumière l'influence de l'immobilisation de l'aptamère sur son affinité. La détermination des paramètres de l'interaction sera effectuée par FACMCE, selon la procédure développée pour l'étude de l'interaction aptamère libre – lysozyme.

Dans le cadre de cette étude, de nouveaux lots de NPs fonctionnalisées ont été synthétisés. Nous nous sommes donc en premier lieu intéressés à une caractérisation succincte de ces nouveaux lots par électrophorèse capillaire, puis nous avons employé la méthode FACMCE pour déterminer les paramètres de l'interaction avec le lysozyme.

### *2.1. Fonctionnalisation de nanoparticules par l'aptamère anti-lysozyme et caractérisation par électrophorèse capillaire*

Les nanoparticules fluorescentes (rhodamine) fonctionnalisées et étudiées précédemment ne permettant pas une détection suffisamment sensible en fluorescence, les stratégies suivantes seront mises en œuvre afin d'améliorer la sensibilité de la détection de fluorescence :

- **diminution du taux de greffage** (nombre d'aptamères par nanoparticule) : augmentation du nombre de nanoparticules initiales ou diminution de la quantité d'aptamère introduite lors de la fonctionnalisation, afin d'obtenir un rapport signal de fluorescence / aptamère plus élevé ;
- **choix d'un fluorophore plus performant** : la fluorescéine permet d'obtenir une sensibilité supérieure à la rhodamine car son maximum d'absorbance (490 nm) se situe dans la gamme du filtre spectral équipant le microscope (460 – 490 nm), contrairement à celui de la rhodamine (540 nm) (Figure 87).

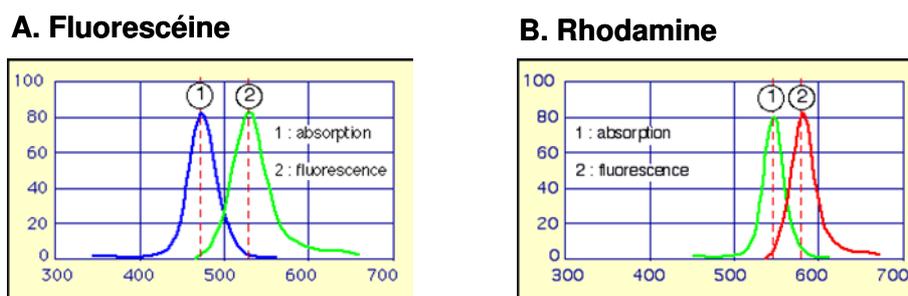


Figure 87 : spectres d'absorption et de fluorescence de la fluorescéine (A) et de la rhodamine (B) [59]

### 2.1.1. Fonctionnalisation des nanoparticules

Des nanoparticules magnétiques constituées d'un cœur de maghémite et d'une coquille de silice contenant un fluorophore, la fluorescéine, et portant des chaînes PEG et amine primaire ont été fonctionnalisées par l'aptamère anti-lysozyme suivant le protocole de greffage décrit dans le paragraphe précédent.

Après fonctionnalisation des chaînes aminées par des fonctions acide carboxylique (-COOH) et passage sur une colonne de dessalage afin d'éliminer l'anhydride succinique en excès, une mesure de taille réalisée par diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering, DLS) a révélé un diamètre hydrodynamique de 64 nm et un diamètre en nombre de 43,5 nm. Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues pour le lot précédent (diamètre hydrodynamique de 47,5 nm). L'indice de polydispersité (pdi) est de 0,1, ce qui est conforme aux valeurs habituellement observées lors de ce type de fonctionnalisation.

L'activation des fonctions -COOH est effectuée par ajout de 100 équivalents (15 mg) de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC). Le couplage avec l'aptamère C3 amino-modifié, issu d'un lot différent de celui employé dans le paragraphe précédent, consiste à ajouter respectivement 8,4 et 11,1  $\mu\text{L}$  d'une solution-mère à 500  $\mu\text{M}$ , ce qui correspond respectivement à 150 et 200 équivalents d'aptamère par rapport à la quantité théorique de fonctions COOH. Les nanoparticules fonctionnalisées obtenues seront désignées respectivement par NP-Apt<sub>150</sub> (Apt / COOH<sub>théo</sub> = 150) et NP-Apt<sub>200</sub> (Apt / COOH<sub>théo</sub> = 200).

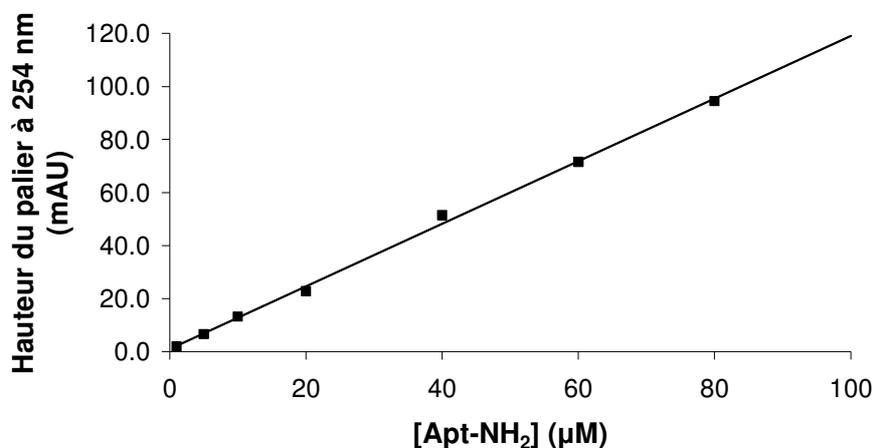
Après isolement et lavage des nanoparticules fonctionnalisées (3 centrifugations de 10 min à 9000 tr/min), celles-ci sont resolubilisées dans 500  $\mu\text{L}$  de tampon MOPS/NaOH 100 mM (pH 7,3). Le volume de surnageant obtenu est de 1320  $\mu\text{L}$  pour les NP-Apt<sub>150</sub> et de 1240  $\mu\text{L}$  pour les NP-Apt<sub>200</sub>. Les nanoparticules résiduelles présentes dans le surnageant sont éliminées par centrifugation (5 centrifugations de 5 min à 13000 tr/min).

## 2.1.2. Détermination du taux de greffage

### 2.1.2.1. Etalonnage de l'aptamère amino-modifié en CZE et FACCE

L'aptamère C3 amino-modifié utilisé lors de la fonctionnalisation des nanoparticules a été injecté à 8 niveaux de concentration compris entre 1 et 100  $\mu\text{M}$  dans un capillaire en silice vierge. L'électrolyte de séparation, identique au tampon de solubilisation des nanoparticules, est le MOPS/NaOH 100 mM (pH 7,3). En mode zone (CZE), les injections hydrodynamiques séquentielles suivantes sont réalisées : échantillon d'aptamère (30 mbars, 3s), BGE (30 mbars, 3s). En mode frontal (FACCE), l'injection électrocinétique de l'aptamère est effectuée en continu. La migration électrophorétique est réalisée par application d'une tension négative de 10 kV (le flux électroosmotique étant inférieur à la mobilité électrophorétique de l'aptamère). Les mesures sont répétées trois fois en CZE, et deux fois en FACCE.

Contrairement à ce qui avait été observé pour le lot d'aptamère C3 amino-modifié précédent, un seul pic est observé en CZE ce qui indique l'absence d'aptamère non modifié pour ce nouveau lot. En mode zone, une corrélation linéaire entre la concentration en aptamère modifié et la hauteur et l'aire corrigée du pic est obtenue sur la gamme 1 – 10  $\mu\text{M}$ . Les coefficients de corrélation des droites obtenues sont cependant assez faibles ( $R^2 \sim 0,98$ ). Au-delà d'une concentration en aptamère de 10  $\mu\text{M}$ , il semble y avoir un phénomène de saturation. En mode frontal, une corrélation linéaire entre la concentration en aptamère modifié et la hauteur du palier est obtenue sur l'ensemble de la gamme étudiée (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) (Figure 88). Le coefficient de corrélation de la droite obtenue est en outre beaucoup plus satisfaisant ( $R^2 = 0,9989$ ). La détermination du taux de greffage par FACCE sera donc vraisemblablement plus correcte que la détermination par CZE.



**Figure 88** : corrélation entre la concentration en aptamère amino-modifié (Apt-NH<sub>2</sub>) injecté et la hauteur du palier obtenu à 254 nm. Equation de la droite de régression linéaire :  $y = 1,1814x + 0,9659$  ( $R^2 = 0,9989$ ). Conditions : cf. Erreur ! Source du renvoi introuvable., sauf injection : électrocinétique en continue.

### 2.1.2.2. Dosage de l'aptamère libre dans le surnageant et détermination du taux de greffage

Les surnageants purs obtenus après le greffage de l'aptamère modifié sur les NPs sont injectés en mode CZE et FACCE, dans des conditions identiques à celles utilisées pour l'étalonnage de l'aptamère modifié. La concentration en aptamère non greffé présent dans le surnageant est déterminée à partir des courbes d'étalonnages établies précédemment. Un calcul direct (méthode FACCE-UV) est également effectué en utilisant la loi de Beer-Lambert (Equation 1) :

$$[Apt]_{\text{surnageant}} = \frac{A_{254}}{\epsilon_{254} l} \quad (1)$$

$[Apt]_{\text{surnageant}}$  est la concentration en aptamère dans le surnageant,  $A_{254}$  la hauteur du palier à 254 nm,  $\epsilon_{254}$  le coefficient d'absorption moléculaire à 254 nm (= 308300 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, valeur théorique donnée par le fournisseur) et  $l$  le diamètre interne du capillaire (50 µm). Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 8.

**Tableau 8 : détermination de la concentration en aptamère dans le surnageant**

Méthode	NP-Apt <sub>150</sub>		NP-Apt <sub>200</sub>	
	Valeur mesurée (mAU)	[Apt] <sub>surnageant</sub> (µM)	Valeur mesurée (mAU)	[Apt] <sub>surnageant</sub> (µM)
<b>Hauteur CZE</b>	1,1	5,7	0,8	3,6
<b>Aire corrigée CZE</b>	9,5	7,4	6,4	4,3
<b>Palier FACCE</b>	4,2	2,8	3,0	1,8
<b>FACCE-UV</b>	4,2	2,7	3,0	1,9

Les concentrations obtenues à partir de l'étalonnage de la hauteur et de l'aire corrigée du pic en CZE sont bien situées dans la gamme de linéarité (< 10 µM) mais sont plus élevées que les valeurs obtenues en FACCE à partir de l'étalonnage de la hauteur du palier et par calcul direct, sans doute du fait d'une moins bonne calibration (corrélation faible et peu de niveaux de concentration sur la gamme de linéarité). En éliminant ces valeurs et en ne tenant compte que des résultats obtenus en FACCE, la concentration en aptamère dans chacun des surnageants est de 2,75 µM (NP-Apt<sub>150</sub>) et 1,85 µM (NP-Apt<sub>200</sub>). Connaissant le volume de surnageant et la quantité d'aptamère introduit, on accède alors aisément au rendement de greffage, puis au taux de greffage connaissant la quantité de nanoparticules introduites (Tableau 9). Le rendement étant légèrement plus faible pour les NP-Apt<sub>150</sub> (35% au lieu de 45%), le taux de greffage est identique pour les deux types de nanoparticules fonctionnalisées,

soit 6 aptamères par nanoparticule, ce qui correspond à une concentration en aptamère d'environ 260 nM. Le taux de greffage a donc été diminué d'un facteur 9 à 10 par rapport à la fonctionnalisation précédente (taux de greffage autour de 50-60 Apt/NP avec Apt / COOH<sub>théo</sub> = 300). Ainsi, en diminuant de 1/3 et 1/2 le rapport Apt / COOH, le taux de greffage est fortement diminué.

**Tableau 9 : détermination du taux de greffage des nanoparticules fonctionnalisées par l'aptamère**

	[Apt] surnageant ( $\mu\text{M}$ )	V <sub>surnageant</sub> ( $\mu\text{L}$ )	n <sub>Apt</sub> surnageant (nmol)	n <sub>Apt</sub> introduit (nmol)	n <sub>Apt</sub> greffé (nmol)	Rdt de greffage (%)	Taux de greffage (Apt/NP)
NP-Apt <sub>150</sub>	2,75	1320	3,63	5,55	1,92	35	6
NP-Apt <sub>200</sub>	1,85	1240	2,29	4,20	1,91	45	6

### 2.1.3. Détermination de la taille des nanoparticules

La taille hydrodynamique des nanoparticules avant et après greffage a été déterminée via des mesures du coefficient de diffusion par électrophorèse capillaire. La procédure, développée au laboratoire [18], consiste à introduire une courte zone de solution de nanoparticules par injection hydrodynamique (30 mbar, 3 s) dans un capillaire en silice vierge contenant le tampon MOPS (100 mM, pH 7,3), puis à percoler (30 mbar) jusqu'à la fenêtre de détection. D'après la théorie de la dispersion de Taylor-Aris [60, 61], le coefficient de diffusion D peut alors être déterminé via l'expression analytique suivante (Equation 2) :

$$D = \frac{R_c^2}{24\sigma^2 t_R} \quad (2)$$

$R_c$  est le rayon interne du capillaire (m),  $\sigma$  la variance temporelle du profil d'élution (s) et  $t_R$  le temps de sortie (s). Le rayon hydrodynamique  $R_h$  des nanoparticules est ensuite calculé en appliquant la relation de Stokes-Einstein (Equation 3) :

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (3)$$

$k_B$  est la constante de Boltzmann ( $1,38 \cdot 10^{-23}$  J.K<sup>-1</sup>), T la température absolue (K),  $\eta$  la viscosité du milieu (Pa.s) et D le coefficient de diffusion (m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>).

Le diamètre hydrodynamique a été déterminé pour chaque échantillon de nanoparticules, dans le tampon MOPS (100 mM, pH 7,3) à 25°C. La variance temporelle  $\sigma$  considérée est la largeur à mi-hauteur du signal obtenu à 254 nm, déterminée par intégration manuelle à l'aide du logiciel Chemstation. Le diamètre hydrodynamique avant greffage (68,9

$\pm 4,5$  nm) est cohérent avec la valeur obtenue en DLS (64 nm). La fonctionnalisation par l'aptamère conduit à une augmentation sensible du diamètre hydrodynamique ( $79,1 \pm 4,2$  pour les NP-Apt<sub>150</sub> et  $82,9 \pm 5,5$  pour les NP-Apt<sub>200</sub> soit une augmentation de 10,2 et 14 nm, respectivement), ce qui prouve la réussite du greffage. Cette augmentation est très supérieure à celle observé sur le lot précédent (diamètre hydrodynamique de 47,5 et 49 nm avant et après greffage, respectivement, soit une augmentation de 1,5 nm seulement). Cette différence pourrait s'expliquer par la forte diminution du taux de greffage, susceptible d'induire une conformation différente de l'aptamère à la surface des NPs.

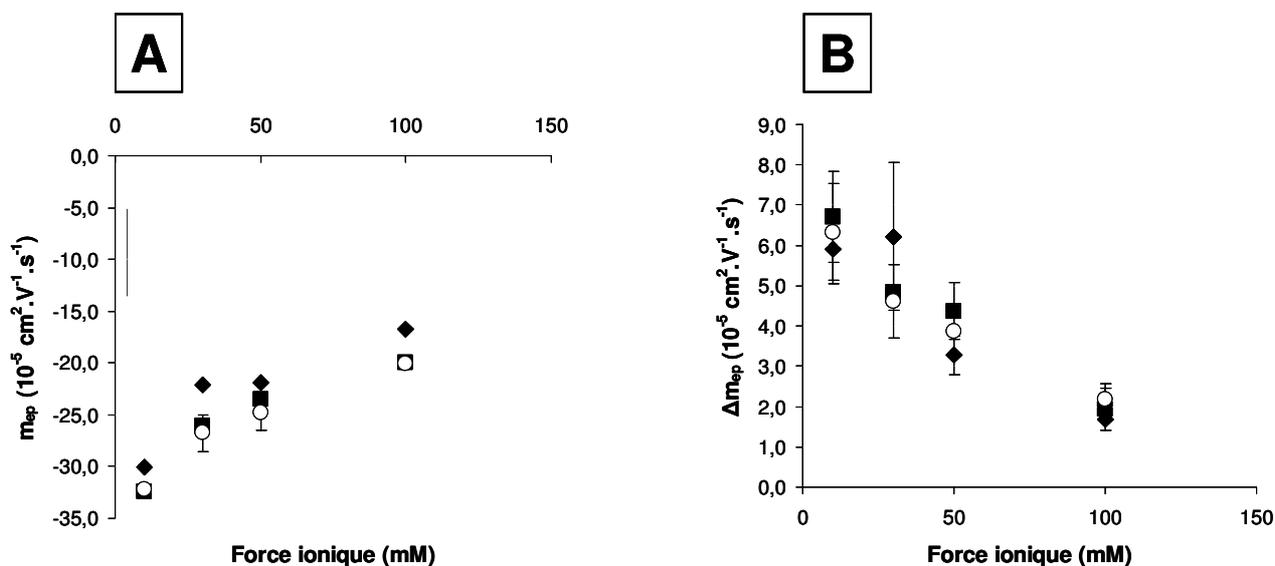
## **2.1.4. Influence des paramètres opératoires sur le comportement électrophorétique des nanoparticules**

Afin de déterminer les conditions opératoires optimales pour l'analyse de l'interaction entre les nanoparticules fonctionnalisées et la cible, l'influence de différents paramètres (force ionique de l'électrolyte, champ électrique appliqué, température) sur le comportement électrophorétique des nanoparticules a été étudiée. La nature et le pH de l'électrolyte (MOPS pH 7,3) ont été choisis de façon à pouvoir réaliser l'interaction NPs fonctionnalisées/cible dans les mêmes conditions que l'interaction aptamère libre/cible.

### **2.1.4.1. Influence de la force ionique**

Les nanoparticules greffées (NP-Apt<sub>150</sub> et NP-Apt<sub>200</sub>) et non greffées (NP-COOH) ont été injectées dans un capillaire en silice vierge contenant un électrolyte MOPS (pH 7,3) de force ionique variable (10, 30, 50 et 100 mM). La migration est effectuée par application d'une tension positive (10 kV). Les profils électrophorétiques obtenus ne présentent aucun signe d'agrégation, démontrant la stabilité des nanoparticules sur la gamme de force ionique étudiée (10 – 100 mM). De plus, les valeurs de mobilité électrophorétiques des NPs greffées (NP-Apt<sub>150</sub> et NP-Apt<sub>200</sub>) sont équivalentes à celles observée pour les lots précédents (NP-3Apt et NP\*-6Apt). L'augmentation de la force ionique de l'électrolyte entraîne une diminution du flux électroosmotique (résultat non montré) du fait de la diminution du potentiel zêta de la surface du capillaire. Parallèlement, on observe une diminution de la valeur absolue de la mobilité électrophorétique des nanoparticules (Figure 89A), qui reflète la diminution du potentiel zêta due à l'augmentation de l'écrantage des co-ions de l'électrolyte.

Cette diminution est légèrement plus marquée pour les nanoparticules non greffées que pour les nanoparticules greffées (respectivement -45% et -38% entre 10 et 100 mM). En outre, la dispersion à mi-hauteur du pic diminue fortement (-70% entre 10 et 100 mM, Figure 89B), sans doute en partie du fait de la diminution de la différence entre la force ionique de l'électrolyte et celle de l'échantillon (100 mM). Ces résultats sont cohérents avec des études précédemment réalisées au laboratoire [17] et ceux obtenus dans le paragraphe précédent.



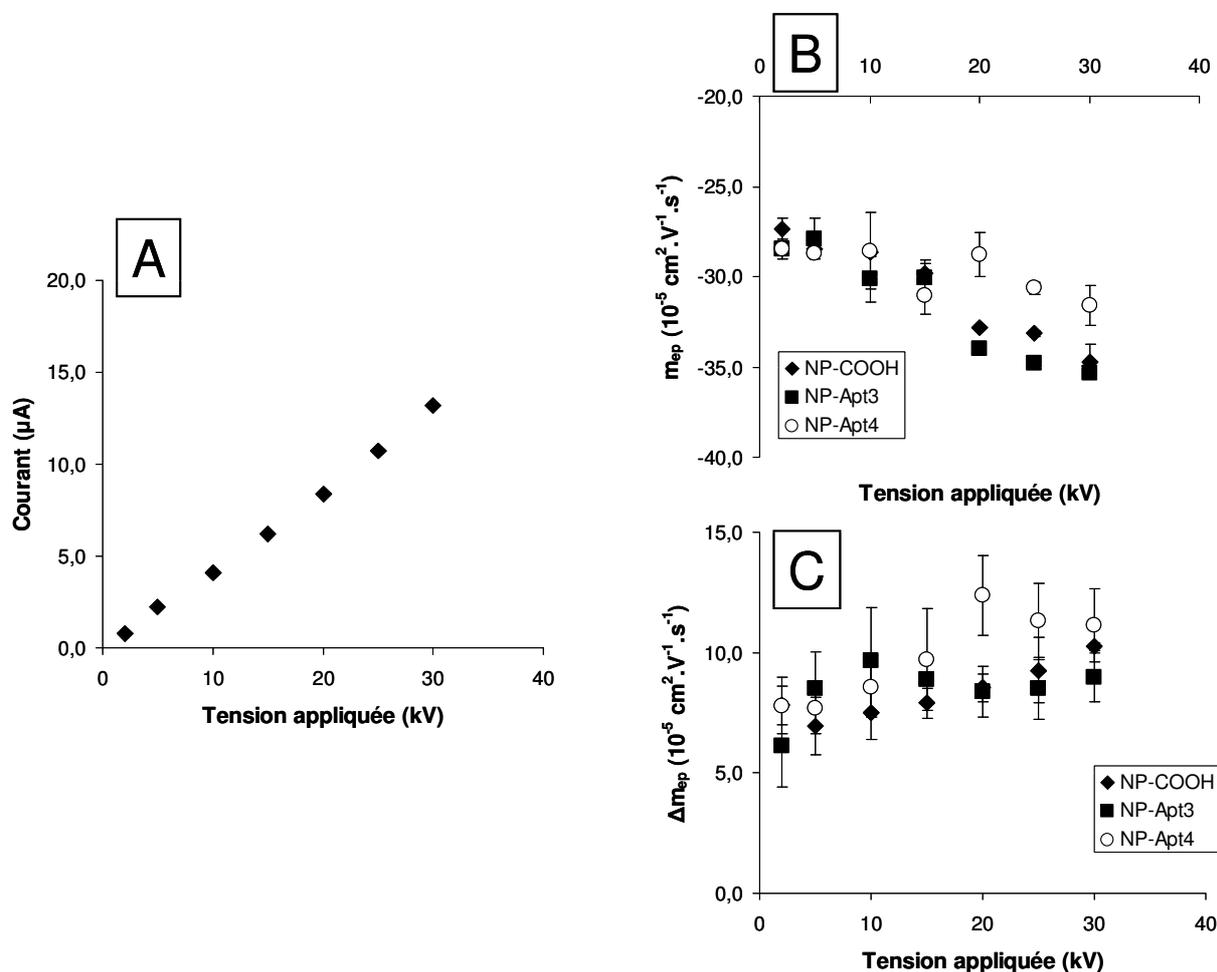
**Figure 89 :** évolution de la mobilité électrophorétique (A) et de la dispersion en mobilité électrophorétique (B) des NP-COOH (◆), NP-Apt<sub>150</sub> (■) et NP-Apt<sub>200</sub> (○) en fonction de la force ionique de l'électrolyte de séparation. Capillaire en silice vierge : 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Marqueur neutre (MN) : Solution aqueuse de formamide 0,05% v/v. Echantillon : solution de nanoparticules NP-COOH (diluée par 3), NP-Apt<sub>150</sub> et NP-Apt<sub>200</sub> (pures) dispersées dans le MOPS (100 mM, pH 7,4). Electrolyte de séparation : MOPS/NaOH 10, 30, 50 ou 100 mM (pH 7,3). Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3s), BGE (30 mbars, 2s), échantillon (30 mbars, 3s), BGE (30 mbars, 2s). Tension appliquée : +10 kV. Température : 25°C. Détection UV : 200/254 nm.

La fonctionnalisation par l'aptamère entraîne une légère augmentation (en valeur absolue) de la mobilité électrophorétique des nanoparticules (respectivement  $-30,1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $-32,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et  $-32,2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  à 10 mM pour les NP-COOH, NP-Apt<sub>150</sub> et NP-Apt<sub>200</sub>). Cette variation peut s'expliquer par le fait que le greffage de l'aptamère, molécule chargée négativement tout comme les NP-COOH, mais de taille comparativement faible, entraîne une augmentation du rapport charge/taille et donc de la mobilité (en valeur absolue). On observe également une légère augmentation de la dispersion en mobilité (respectivement  $5,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $6,7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et  $6,3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  à 10 mM pour les NP-COOH, Apt<sub>150</sub> et NP-Apt<sub>200</sub>) pouvant refléter une augmentation de la polydispersité des nanoparticules due à l'hétérogénéité apportée par l'aptamère. Aucune différence notable de comportement électrophorétique n'est observée entre les deux types de nanoparticules

greffées (NP-Apt<sub>150</sub> et NP-Apt<sub>200</sub>), ce qui est cohérent avec le taux de greffage moyen identique (6 apt/NP) déterminé précédemment.

### 2.1.4.2. Influence du champ électrique

Les nanoparticules greffées (NP-Apt<sub>150</sub> et NP-Apt<sub>200</sub>) et non greffées (NP-COOH) ont été injectées dans un capillaire en silice vierge contenant l'électrolyte MOPS (10 mM, pH 7,3). La migration est effectuée par application d'une tension positive variable (2 – 30 kV). La loi d'Ohm est vérifiée sur la gamme de tension étudiée (Figure 90A), et les valeurs de courant relevées restent largement inférieures à 60  $\mu\text{A}$  ( $I = 15 \mu\text{A}$  pour une tension de 30 kV), ce qui garantit l'absence de diffusion thermique par effet Joule.



**Figure 90 :** évolution du courant (A), de la mobilité électrophorétique (B) et de la dispersion en mobilité électrophorétique (C) des NP-COOH (◆), NP-Apt<sub>150</sub> (■) et NP-Apt<sub>200</sub> (○) en fonction de la tension appliquée. Capillaire en silice vierge : 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Marqueur neutre (MN) : Solution aqueuse de formamide 0,05% v/v. Echantillon : solution de nanoparticules NP-COOH (diluée par 3), NP-Apt<sub>150</sub> et NP-Apt<sub>200</sub> (pures) dispersées dans le MOPS (100 mM, pH 7,4). Electrolyte de séparation : MOPS/NaOH 10 mM (pH 7,3). Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3s), BGE (30 mbars, 2s), échantillon (30 mbars, 3s), BGE (30 mbars, 2s). Tension appliquée : positive, 2 - 30 kV. Température : 25°C. Détection UV : 200/254 nm.

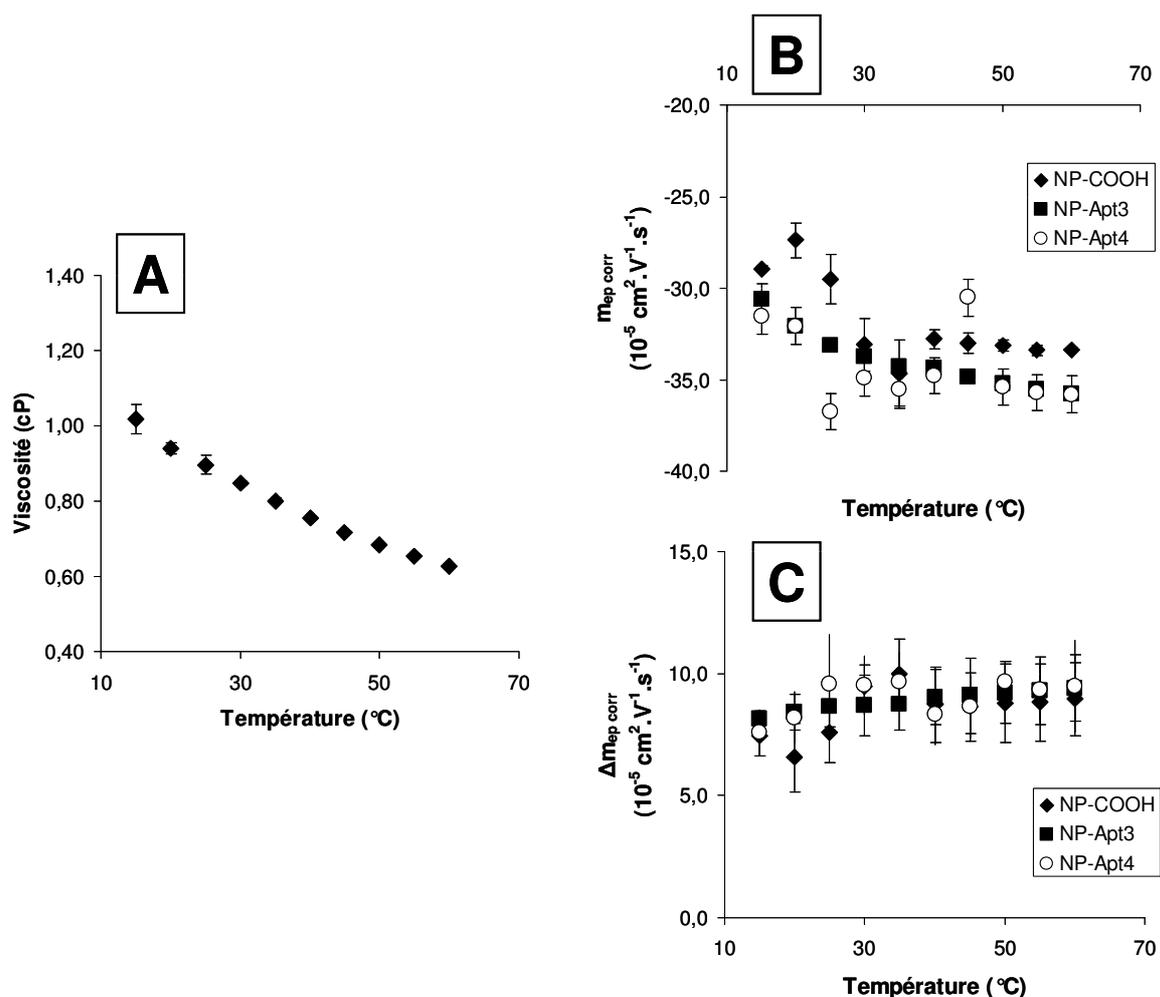
Les profils électrophorétiques obtenus ne présentent aucun signe d'agrégation, démontrant la stabilité des nanoparticules sur la gamme de champ électrique correspondante (57,1 – 857,1 V.cm<sup>-1</sup>). L'augmentation du champ électrique appliqué entraîne une augmentation de la valeur absolue de la mobilité électrophorétique (respectivement +27%, +24% et +11% pour les NP-COOH, Apt<sub>150</sub> et NP-Apt<sub>200</sub> entre 2 et 30 kV, Figure 90B), pouvant s'expliquer par une diminution de l'écrantage des contre-ions par dissociation des paires d'ions.

On observe également une augmentation sensible de la dispersion des mobilités (Figure 90C), plus marquée pour les nanoparticules greffées (respectivement +31%, +47% et +43% pour les NP-COOH, NP-Apt<sub>150</sub> et NP-Apt<sub>200</sub> entre 2 et 30 kV).

### ***2.1.4.3. Influence de la température***

Les nanoparticules greffées (NP-Apt<sub>150</sub> et NP-Apt<sub>200</sub>) et non greffées (NP-COOH) ont été injectées dans un capillaire en silice vierge contenant l'électrolyte MOPS (10 mM, pH 7,3). La migration est effectuée par application d'une tension positive (10 kV), à différentes températures (15 – 60°C). Des mesures de viscosité sont également effectuées (Figure 91A) afin de corriger les données expérimentales. Les profils électrophorétiques obtenus ne présentent aucun signe d'agrégation, démontrant la stabilité des nanoparticules sur la gamme de température étudiée (15 – 60°C).

On observe une légère augmentation de la valeur absolue de la mobilité électrophorétique corrigée (Figure 91B) lorsque la température augmente, ce qui est en accord avec les résultats observés sur les lots de NPs étudiés dans le paragraphe précédent (même ordre de grandeur). La dispersion électrophorétique corrigée augmente également dans une moindre mesure, mais la variation observée est à la limite de significativité (Figure 91C).



**Figure 91 :** évolution de la viscosité (A), de la mobilité électroosmotique (B), de la mobilité électrophorétique (C) et de la dispersion en mobilité électrophorétique (D) des NP-COOH (◆), NP-Apt<sub>150</sub> (■) et NP-Apt<sub>200</sub> (○) en fonction de la température. Capillaire en silice vierge : 50 μm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Marqueur neutre (MN) : Solution aqueuse de formamide 0,05% v/v. Echantillon : solution de nanoparticules NP-COOH (diluée par 3), NP-Apt<sub>150</sub> et NP-Apt<sub>200</sub> (pures) dispersées dans le MOPS (100 mM, pH 7,4). Electrolyte de séparation : MOPS/NaOH 10 mM (pH 7,3). Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3s), BGE (30 mbars, 2s), échantillon (30 mbars, 3s), BGE (30 mbars, 2s). Tension appliquée : +10 kV. Température : 15 – 60°C. Détection UV : 200/254 nm.

## 2.1.5. Conclusion

Le dosage de l'aptamère dans le surnageant ainsi que la détermination du diamètre hydrodynamique des nanoparticules ont permis de mettre en évidence l'efficacité de la fonctionnalisation par l'aptamère modifié. Un taux de greffage moyen de 6 aptamères par nanoparticules a été calculé. L'étude de l'influence de différents paramètres opératoires (force ionique de l'électrolyte, champ électrique appliqué, température) sur le comportement électrophorétique des nanoparticules a mis en évidence une bonne stabilité colloïdale des nanoparticules greffées et non greffées sur les gammes de force ionique (10 – 100 mM), de champ électrique (57,1 – 857,1 V.cm<sup>-1</sup>) et de température (15 – 60°C) étudiées.

## ***2.2. Etude de l'interaction lysozyme – nanoparticule fonctionnalisée par l'aptamère par analyse frontale électrocinétique continue en microsysteme (FACMCE)***

Après avoir caractérisé les nanoparticules fonctionnalisées par l'aptamère anti-lysozyme en termes de taux de greffage, taille hydrodynamique et comportement électrophorétique, nous avons étudié leur interaction avec le lysozyme par analyse frontale électrocinétique en microsysteme (FACMCE) en utilisant la méthode développée pour la caractérisation de l'interaction entre le lysozyme et l'aptamère libre marqué.

### **2.2.1. Conditions opératoires**

Les analyses sont réalisées à température ambiante sur une puce en verre (Micronit Microfluidics, Enschede, Pays-Bas) comportant un simple canal (7,3 cm de longueur, 20  $\mu\text{m}$  de profondeur et 50  $\mu\text{m}$  de largeur). Des réservoirs (Oak, Harbor, Etats-Unis) ont été fixés au niveau des puits afin d'accroître leur volume.

La détection est effectuée grâce à un microscope IX-71 à fluorescence inversée (Olympus, France) équipé d'un filtre spectral 460-490 nm, d'une lampe à mercure 100 W et d'une caméra CCD 1388x1038 pixels Pike (RD Vision, France). Le pilotage de la caméra ainsi que le traitement de l'image sont effectués grâce au logiciel Hiris RD Vision, France). La tension est appliquée aux bornes du canal par l'intermédiaire d'électrodes de platine plongées dans les réservoirs et reliées à un générateur haute tension Micralyne (Edmonton, Alberta, Canada).

Après trois lavages à l'eau ultrapure puis avec l'électrolyte de séparation (MOPS 100 mM pH 7,3), les puits d'entrée et de sortie sont remplis respectivement avec l'échantillon et l'électrolyte de séparation. Le détecteur est placé à mi-canal (longueur effective 3,65 cm) et une tension négative de 2200 V est appliquée et l'injection électrocinétique de l'échantillon est effectuée de façon continue.

Afin de réduire le flux électroosmotique et les phénomènes d'adsorption, la surface du canal est modifiée par un polymère neutre, l'hydroxypropylcellulose (HPC), selon la procédure développée par Poitevin et al. [62]. La mobilité électroosmotique est estimée [63] en mesurant la mobilité apparente d'une solution de fluorescéine (0,01 mg.mL<sup>-1</sup>, diluée dans le BGE) dans un électrolyte borate de sodium (9 mM, pH 9,2), connaissant sa mobilité

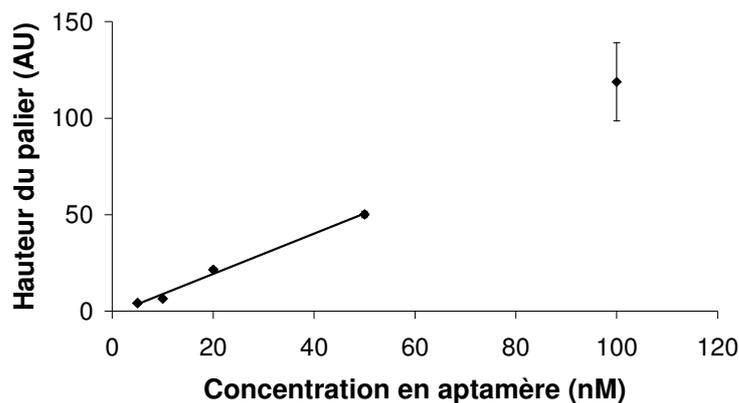
électrophorétique dans ces conditions ( $-38,0 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Un flux électroosmotique de  $13,9 \pm 0,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  présentant une stabilité temporelle satisfaisante a été mesuré.

### 2.2.2. Etalonnage de la hauteur du palier de concentration de l'aptamère greffé par FACMCE

Dans un premier temps, nous avons vérifié la linéarité de la hauteur des paliers de concentration de l'aptamère greffé en fonction de sa concentration dans le mélange injecté. Pour cela, les nanoparticules fonctionnalisées NP-Apt<sub>150</sub> ont été injectées dans les conditions décrites précédemment, à 5 niveaux de dilution correspondant à des concentrations en aptamère comprises entre 5 et 100 nM. Trois mesures successives sont réalisées pour chaque concentration afin de tester la répétabilité.

Le palier de concentration obtenu est horizontal ; pour les concentrations les plus faibles ( $[\text{Apt}] \leq 20 \text{ nM}$ ), on observe parfois une légère diminution du signal pouvant être attribué à un phénomène d'extinction de fluorescence ou « quenching ». Les électrophérogrammes obtenus présentent parfois des « spikes », qui pourraient correspondre à la formation d'agrégats, visualisés à l'image par une augmentation locale de la fluorescence (taches lumineuses). Le temps de migration du front augmente au cours des analyses successives, ce qui traduit une diminution de la mobilité apparente des nanoparticules et entraîne un étalement progressif du signal. En se basant sur la mobilité électrophorétique des NP-Apt<sub>150</sub> déterminée par CZE dans le même milieu (MOPS 100 mM, pH 7,3), il apparaît que le flux électroosmotique présente une augmentation sensible au cours des analyses successives (de  $8,2$  à  $13,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  soit une augmentation de 64% entre la 1<sup>ère</sup> et la 15<sup>ème</sup> analyse.), ce qui pourrait s'expliquer par une légère adsorption des nanoparticules à la surface du canal.

Une corrélation linéaire entre la concentration en aptamère et la hauteur du palier ainsi qu'une bonne répétabilité inter-échantillon ( $\Delta h < 2$  unités) sont obtenues sur la gamme 5 – 50 nM (Figure 92). Les mesures correspondant à une concentration en aptamère de 100 nM présentent un écart à la linéarité ainsi qu'une mauvaise répétabilité ( $\Delta h = 20$  unités), peut-être dues à un phénomène d'agrégation plus important, ou à une adsorption sur la paroi du canal de séparation. La sensibilité obtenue est très élevée, avec une limite de détection ( $S/N = 3$ ) estimée à 0,2 nM (contre 10 nM pour l'aptamère libre marqué, soit une sensibilité environ 50 fois plus élevée).

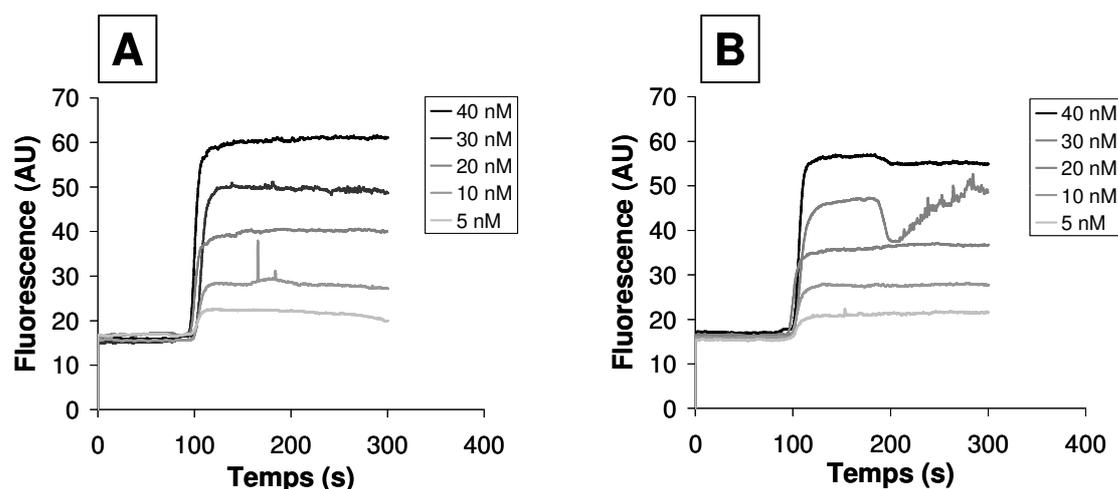


**Figure 92 : corrélation entre la concentration en aptamère anti-lysozyme injectée et la hauteur du palier de concentration des nanoparticules fonctionnalisées NP-Apt<sub>150</sub>. Equation de la droite de régression linéaire (n = 4) :  $y = 1,0438x - 1,5844$  ( $R^2 = 0,9918$ ).** Puce en verre avec canal modifié HPC : 20  $\mu\text{m}$  de profondeur, 50  $\mu\text{m}$  de largeur et 7,3 cm de longueur totale (détection 3,65 cm). Echantillon : solution de NP-Apt<sub>150</sub> diluée dans l'électrolyte de séparation (facteur de dilution de 2,6 à 52), correspondant à une concentration en aptamère de 5 à 100 nM. Electrolyte de séparation : MOPS/NaOH 100 mM (pH 7,3). Injection électrocinétique continue. Tension appliquée : -2200V. Température : 25°C. Détection : fluorescence.

### 2.2.3. Etude de l'interaction lysozyme – nanoparticule fonctionnalisée par l'aptamère par FACMCE

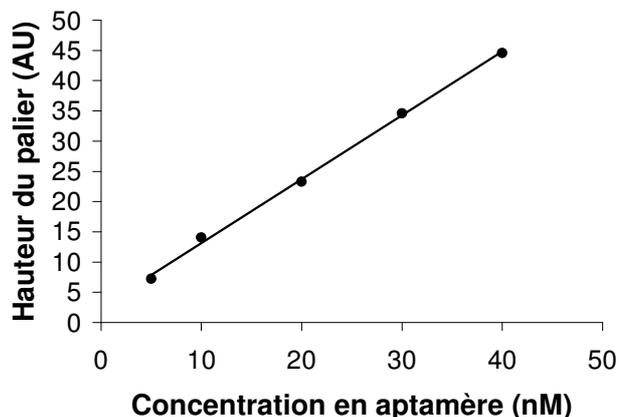
#### 2.2.3.1. Détermination des paramètres d'interaction

Des mélanges NP-Apt<sub>150</sub> – lysozyme, de concentration constante en lysozyme (100 nM) et de concentrations variables en nanoparticules, réparties en 5 niveaux (concentration correspondante en aptamère 5 – 40 nM) ont été préparés dans l'électrolyte MOPS 100 mM (pH 7,3) puis analysés par FACMCE selon le protocole décrit précédemment. En parallèle, des solutions de nanoparticules de même concentration mais ne contenant pas de lysozyme ont été analysées afin d'établir une courbe de calibrage. Les profils électrophorétiques obtenus sont présentés sur la Figure 93. La présence de lysozyme dans le mélange entraîne une diminution de la hauteur du palier de NP-Apt<sub>150</sub> libre, qui reflète une diminution de sa concentration pouvant être attribuée à la complexation de l'aptamère greffé avec le lysozyme.



**Figure 93 :** électrophérogrammes obtenus par injection électrocinétique continue de nanoparticules fonctionnalisées NP-Apt<sub>150</sub> à 5 niveaux de dilution correspondant à des concentrations en aptamère 5 – 40 nM seules (A) ou mélangées avec 100 nM de lysozyme (B). Puce en verre avec canal modifié HPC : 20 µm de profondeur, 50 µm de largeur et 7,3 cm de longueur totale (détection 3,65 cm). Echantillon : solution de NP-Apt<sub>150</sub> diluée dans l'électrolyte de séparation (facteur de dilution de 6,5 à 52), correspondant à une concentration en aptamère de 5 à 40 nM seule (A) ou mélangée avec 100 nM de lysozyme (B). Electrolyte de séparation : MOPS/NaOH 100 mM (pH 7,3). Injection électrocinétique continue. Tension appliquée : -2200V. Température : 25°C. Détection : fluorescence.

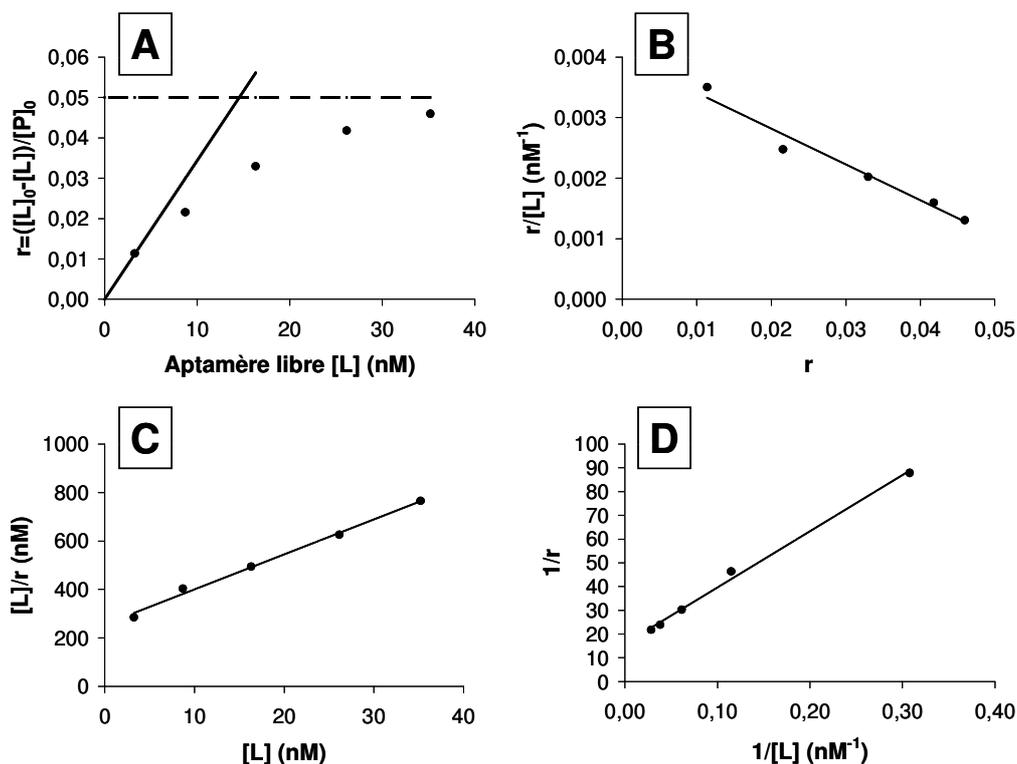
La concentration en aptamère libre est déduite de la hauteur du palier en utilisant la droite d'étalonnage réalisée en parallèle (Figure 94). On remarquera que celle-ci est très similaire à celle obtenue précédemment (Figure 92), démontrant la répétabilité de la méthode. Les données expérimentales ont été exploitées en faisant jouer au lysozyme le rôle de substrat et à l'aptamère celui de ligand.



**Figure 94 :** corrélation entre la concentration en aptamère anti-lysozyme injectée et la hauteur du palier de concentration des nanoparticules fonctionnalisées NP-Apt<sub>150</sub>. Equation de la droite de régression linéaire (n = 5) :  $y = 1,055x - 2,6118$  ( $R^2 = 0,9983$ ). Conditions : cf. Figure 93.

La concentration en aptamère étant variable, la détermination des paramètres de l'interaction est basée sur l'évolution de la concentration en ligand (aptamère) libre, directement mesurable. L'isotherme d'adsorption (Figure 95A) et ses formes linéarisées (x-réciproque ou

représentation de Scatchard, y-réciproque et double-réciproque) (Figure 95B-D) sont ensuite obtenus via les équations établies dans l'Annexe 5.



**Figure 95 :** représentation des données expérimentales obtenues pour la détermination de l'interaction aptamère greffé – lysozyme par FACMCE sous les formes de l'isotherme (A), x-réciproque (B), y-réciproque (C) et double réciproque (D). Equations des droites de régression linéaire ( $n = 5$ ) : (B)  $y = -0,0592x + 0,004$  ( $R^2 = 0,9669$ ) ; (C)  $y = 14,453x + 255,9$  ( $R^2 = 0,9939$ ) ; (D)  $y = 236,51x + 15,998$  ( $R^2 = 0,9956$ ). Conditions : cf. Figure 93.

Une linéarité satisfaisante est obtenue sur l'ensemble de la gamme de concentration en aptamère étudiée. La détermination des paramètres de l'interaction aptamère greffé – lysozyme (Tableau 10) conduit à des valeurs de constante de dissociation ligand-site ( $k_d$ ) de  $16,0 \pm 1,6$  nM, et à un nombre de sites sur le lysozyme,  $n$ , de  $0,06 \pm 0,01$ .

**Tableau 10 :** paramètres d'interaction obtenus via les différentes méthodes de linéarisation pour l'interaction aptamère greffé – lysozyme par FACMCE

Méthode	$k_d$ (nM)	$n$
isotherme	14,5	0,05
x-réciproque	16,9	0,07
y-réciproque	17,7	0,07
double-réciproque	14,8	0,06
Moyenne	$16,0 \pm 1,6$	$0,06 \pm 0,01$

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors d'une expérience menée en parallèle dans les mêmes conditions avec l'aptamère libre marqué ( $k_d = 7,6 \pm 1,8$  et  $n = 0,05 \pm 0,01$ ). La légère

augmentation de la constante de dissociation peut s'expliquer par une diminution de l'affinité de l'aptamère du fait de son immobilisation.

### 2.2.3.2. Test de spécificité

Afin de vérifier la spécificité de l'interaction observée, les manipulations précédentes ont été réitérées en remplaçant le lysozyme par le cytochrome c, protéine modèle également fortement basique (pI =10). Aucune variation de la hauteur du palier de concentration des nanoparticules n'a été observée en présence de cytochrome c (résultats non montrés), démontrant l'absence d'interaction avec l'aptamère greffé sur la gamme de concentrations étudiée et de ce fait la spécificité de l'interaction observée entre l'aptamère greffé et le lysozyme. Ceci n'exclue cependant pas l'existence d'interactions non spécifiques (notamment électrostatiques, les partenaires étant de charge opposées) caractérisées par une constante d'affinité plus faible et se déroulant par conséquent sur une gamme de concentrations plus élevée.

## 2.3. Conclusion

Le dosage de l'aptamère dans le surnageant ainsi que la détermination du diamètre hydrodynamique des nanoparticules ont permis de mettre en évidence l'efficacité de la fonctionnalisation par l'aptamère modifié. Un taux de greffage moyen de 6 aptamères par nanoparticules a été calculé. L'étude de l'influence de différents paramètres opératoires (force ionique de l'électrolyte, champ électrique appliqué, température) sur le comportement électrophorétique des nanoparticules a mis en évidence une bonne stabilité colloïdale des nanoparticules greffées et non greffées sur les gammes de force ionique (10 – 100 mM), de champ électrique (57,1 – 857,1 V.cm<sup>-1</sup>) et de température (15 – 60°C) étudiées.

La détermination par FACMCE des paramètres de l'interaction aptamère greffé – lysozyme conduit à des paramètres d'interaction ( $k_d = 16,0 \pm 1,6$  nM, et  $n = 0,06 \pm 0,01$ ) similaires à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec l'aptamère libre marqué. La spécificité de l'interaction a été démontrée sur la gamme de concentration en aptamère étudiée (5 – 40 nM).

## Conclusion

Cette étude a démontré la faisabilité de la fonctionnalisation de nanoparticules magnétiques cœur / coquille par l'aptamère et de la caractérisation par électrophorèse capillaire de zone (CZE) des objets obtenus en termes de taux de greffage, de comportement électrophorétique et de stabilité colloïdale. L'étude par FACMCE de l'interaction entre l'aptamère greffé et sa cible a mis en évidence une affinité semblable à celle de l'aptamère libre, ce qui permet d'envisager l'utilisation de ces objets comme outils de bio-reconnaissance moléculaire, notamment dans des systèmes électrophorétiques.

## Références bibliographiques

- [1] Lou, X. W., Archer, L. A., Yang, Z., *Advanced Materials* 2008, 20.
- [2] Sanvicens, N., Marco, M. P., *Trends Biotechnol.* 2008, 26, 425-433.
- [3] Pumera, M., Sánchez, S., Ichinose, I., Tang, J., *Sensors and Actuators B: Chemical* 2007, 123, 1195-1205.
- [4] Gómez-Hens, A., Fernández-Romero, J. M., Aguilar-Caballos, M. P., *Trends Anal. Chem.* 2008, 27, 394-406.
- [5] Murphy, M. B., Fuller, S. T., Richardson, P. M., Doyle, S. A., *Nucl. Acids res.* 2003, 31, e110.
- [6] Herr, J. K., Smith, J. E., Medley, C. D., Shangguan, D., Tan, W., *Anal. Chem.* 2006, 78, 2918-2924.
- [7] Chen, H. W., Medley, C. D., Sefah, K., Shangguan, D., *et al.*, *ChemMedChem* 2008, 3, 991-1001.
- [8] Huang, C.-C., Huang, Y.-F., Cao, Z., Tan, W., Chang, H.-T., *Anal. Chem.* 2005, 77, 5735-5741.
- [9] Polsky, R., Gill, R., Kaganovsky, L., Willner, I., *Anal. Chem.* 2006, 78, 2268-2271.
- [10] He, P., Shen, L., Cao, Y., Li, D., *Anal. Chem.* 2007, 79, 8024-8029.
- [11] Pavlov, V., Xiao, Y., Shlyahovsky, B., Willner, I., *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 11768-11769.
- [12] Langer, R., Farokhzad, O. C., Cheng, J., Teply, B. A., *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, 103, 6315-6320.
- [13] Wang, A. Z., Bagalkot, V., Vasilliou, C. C., Gu, F., *et al.*, *ChemMedChem* 2008, 3, 1311-1315.
- [14] Pyell, U., *Electrophoresis* 2010, 31, 814-831.
- [15] d'Orlye, F., Varenne, A., Gareil, P., *Electrophoresis* 2008, 29, 3768-3778.
- [16] Pyell, U., *Electrophoresis* 2008, 29, 576-589.
- [17] d'Orlye, F., Varenne, A., Georgelin, T., Siaugue, J.-M., *et al.*, *Electrophoresis* 2009, 30, 2572-2582.
- [18] d'Orlye, F., Varenne, A., Gareil, P., *J. Chromatogr. A* 2008, 1204, 226-232.
- [19] Surugau, N., Urban, P. L., *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 1889-1906.
- [20] Radko, S. P., Chrambach, A., *Electrophoresis* 2002, 23, 1957-1972.
- [21] Vicente, G., Colón, L. A., *Anal. Chem.* 2008, 80, 1988-1994.
- [22] Huang, X., Weng, J., Sang, F., Song, X., *et al.*, *J. Chromatogr. A* 2006, 1113, 251-254.
- [23] Wang, F.-H., Takashi, Y., Do-Kyung, K., Muhammed, M., *et al.*, *Nanoparticle Research* 2003, 5, 137-146.
- [24] Petr, J., Teste, B., Descroix, S., Siaugue, J.-M., *et al.*, *Electrophoresis* 2010.
- [25] Famulok, M., Mayer, G., Blind, M., *Acc. Chem. Res.* 2000, 33, 591-599.
- [26] Jayasena, S. D., *Clin. Chem.* 1999, 45, 1628-1650.
- [27] O'Sullivan, C. K., Mairal, T., Özalp, V. C., Sánchez, P. L., *et al.*, *Anal. Biochem.* 2008, 390, 989-1007.
- [28] Strehlitz, B., Stoltenburg, R., Reinemann, C., *Biomol. Engineering* 2007, 24, 381-403.
- [29] Le Floch, F., Ho, H. A., Leclerc, M., *Anal. Chem.* 2006, 78, 4727-4731.
- [30] Sampson, T., *World Patent Information* 2003, 25, 123-129.
- [31] Bowser, M. T., Mosing, R. K., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 1420-1426.
- [32] Famulok, M., Hartig, J. S., Mayer, G., *Chem. Rev.* 2007, 107, 3715-3743.
- [33] Peyrin, E., Ravelet, C., Grosset, C., *J. Chromatogr. A* 2006, 1117, 1-10.

- [34] Minunni, M., Tombelli, S., Gulotto, S., Luzi, A., Mascini, M., *Biosens. Bioelec.* 2004, 20, 1149-1156.
- [35] Liss, M., Petersen, B., Wolf, H., Prohaska, E., *Anal. Chem.* 2002, 74, 4488-4495.
- [36] Kirby, R., Cho, E. J., Gehrke, B., Bayer, T., *et al.*, *Anal. Chem.* 2004, 76, 4066-4075.
- [37] Michaud, M., Jourdan, E., Villet, A., Ravel, A., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 8672-8679.
- [38] Clark, S. L., Remcho, V. T., *Anal. Chem.* 2003, 75, 5692-5696.
- [39] Clark, S. L., Remcho, V. T., *Electrophoresis* 2002, 23, 1335-1340.
- [40] Doyle, S. A., Murphy, M. B., Fuller, S. T., Richardson, P. M., *Nucl. Acids res.* 2003, 31, e110.
- [41] Tan, W., Herr, J. K., Smith, J. E., Medley, C. D., Shangguan, D., *Anal. Chem.* 2006, 78, 2918-2924.
- [42] Chang, H.-T., Huang, C.-C., Huang, Y.-F., Cao, Z., Tan, W., *Anal. Chem.* 2005, 77, 5735-5741.
- [43] Huang, X., Weng, J., Sang, F., Song, X., *et al.*, *J. Chromatogr. A* 2006, 1113, 251-254.
- [44] Massart, R., *IEEE Transactions on Magnetics* 1981, 17, 1247-1248.
- [45] Fauconnier, N., Bee, A., Roger, J., Pons, J. N., *Prog. Colloid. Polym. Sci.* 1996, 100, 212-216.
- [46] Lu, Y., Yin, Y., Mayers, B. T., Xia, Y., *Nano Lett.* 2002, 2, 183-186.
- [47] Georgelin, T., Maurice, V., Malezieux, B., Siaugue, J.-M., Cabuil, V., *J. Nanopart. Res.* 2010, 12, 675-680.
- [48] Maurice, V., Georgelin, T., Siaugue, J.-M., Cabuil, V., *J. Magn. Magn. Mater.* 2009, 321, 1408-1413.
- [49] Varenne, A., Gareil, P., Collic-Jouault, S., Daniel, R., *Anal. Biochem.* 2003, 315, 152-159.
- [50] Girardot, M., Gareil, P., Varenne, A., *Electrophoresis* 2010, 31, 546-555.
- [51] in: Lide, D. R. (Ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton, FL 2004.
- [52] Evenhuis, C. J., Haddad, P. R., *Electrophoresis* 2009, 30, 897-909.
- [53] Vinther, A., Sørensen, H., *J. Chromatogr. A* 1991, 559, 27-42.
- [54] Delrow, J. J., Heath, P. J., Fujimoto, B. S., Schurr, J. M., *Biopolymers (Nucleic Acids Sciences)* 1998, 45, 503-515.
- [55] François, Y., Zhang, K., Varenne, A., Gareil, P., *Anal. Chim. Acta* 2006, 562, 164-170.
- [56] Nagasawa, M., in: Selegny, E. (Ed.), *Polyelectrolytes*, Reidel, Dordrecht 1974, pp. 57-77.
- [57] Manning, G. S., *Biophys. Chem.* 1977, 7, 95-102.
- [58] Manning, G. S., *Q. Rev. Biophys. Chem.* 1978, 11, 178-246.
- [59] <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Microscopie/fluo/imagesfluo/>.
- [60] Taylor, G., *Proc. R. Soc. Lond. A* 1953, 219, 186-203.
- [61] Aris, R., *Proc. R. Soc. Lond. A* 1956, 235, 67-77.
- [62] Poitevin, M., Shakalisava, Y., Miserere, S., Peltre, G., *et al.*, *Electrophoresis* 2009, 30, 4256-4263.
- [63] Shakalisava, Y., Poitevin, M., Viovy, J.-L., Descroix, S., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 1030-1033.

# Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation d'aptamères libres en solution ou greffés sur des nanoparticules et de leur affinité par des méthodes électrocinétiques, en vue de leur utilisation comme outil de bio-reconnaissance moléculaire, principalement à travers l'exemple d'un aptamère dirigé contre une cible protéique fortement basique, le lysozyme.

Dans le cadre de l'analyse du lysozyme, différentes stratégies de modification du capillaire ont été envisagées, de façon à limiter les phénomènes d'adsorption et ainsi permettre la caractérisation de la cible par électrophorèse capillaire de zone (CZE). Ainsi, l'emploi de conditions extrêmes de pH, la modification dynamique du capillaire par le polybrène (PB) et l'oxyde de polyéthylène (PEO), la modification permanente par l'alcool polyvinylique (PVA) et l'hydroxypropylcellulose (HPC) ainsi que le préconditionnement acide du capillaire pour générer un phénomène d'hystérèse de pH ont été testés pour la détection et quantification du lysozyme. La modification permanente par physisorption d'un polymère neutre, l'hydroxypropylcellulose (HPC), semble offrir le meilleur compromis entre la limitation de l'adsorption du lysozyme et la compatibilité avec l'analyse de l'aptamère. L'optimisation du procédé de greffage (débit de percolation, temps d'incubation, mode de réalisation de la fenêtre de détection) et des conditions opératoires (post-conditionnement, force ionique de l'électrolyte, ajout de glycérol) ont permis de limiter l'adsorption résiduelle du lysozyme. Ces travaux nous ont donc permis de sélectionner les conditions expérimentales pour les analyses ultérieures mettant en jeu le lysozyme et son aptamère.

Puis nous nous sommes intéressés à la caractérisation de l'aptamère dirigé contre le lysozyme. Dans un premier temps, l'aptamère a été caractérisé par spectrométrie de masse. L'infusion directe de l'aptamère a permis d'optimiser les conditions opératoires, notamment la tension de fragmentation. La migration électrophorétique de l'aptamère a ensuite été étudiée via un couplage CE/ESI-MS. La faible sensibilité ne permet cependant pas d'envisager ce mode de détection pour l'analyse de l'aptamère. L'interaction entre l'aptamère

anti-lysozyme et divers cations monovalents (sodium, potassium, césium) et divalents (magnésium, calcium, barium) a ensuite été étudiée par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE), mettant en évidence l'influence de ces derniers sur le comportement électrophorétique de l'aptamère. Les variations de la mobilité électrophorétique de l'aptamère en fonction de la concentration en cation dans l'électrolyte ont été interprétées en termes de variation de force ionique et de condensation de contre-ions (théorie de Manning). Dans le cas des monocations, la mobilité effective de l'aptamère semble principalement influencée par la force ionique ainsi que par la nature de l'électrolyte de séparation, ce qui suggère l'existence d'interactions entre l'aptamère et le co-ion de l'électrolyte. En présence de dications, l'évolution de la mobilité effective est liée aux effets de force ionique et de condensation de contre-ions, ainsi qu'à d'autres phénomènes tels qu'une complexation binaire ou ternaire avec les constituants de l'électrolyte et/ou un possible changement de conformation de l'aptamère. Ces hypothèses ont été appuyées par la détermination des constantes d'affinité apparentes entre l'aptamère et les différents dications, via des méthodes de linéarisation mathématique. Des résultats comparables ont été obtenus lors de l'étude de l'interaction entre l'aptamère anti-lysozyme et le magnésium par analyse frontale électrocinétique continue (FACCE). Ainsi, ces résultats ont montré l'importance des conditions expérimentales sur le comportement électrophorétique de l'aptamère et ont ouvert la voie à une compréhension de l'influence des constituants du milieu sur la configuration de l'aptamère et donc probablement sur son affinité en tant qu'outil analytique de bio-reconnaissance.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'étude de l'interaction entre l'aptamère libre en solution et la cible protéique. Le système choisi présentait un certain nombre de difficultés : nécessité de travailler en capillaire modifié afin de limiter l'adsorption du lysozyme, constante de dissociation faible par rapport à la sensibilité de la détection UV... Ainsi, dans une étude préliminaire (présentée en annexe), nous nous sommes intéressés à la détermination de la constante d'interaction d'un système modèle aptamère – thrombine, système déjà bien décrit dans la littérature, par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) avec détection UV. Cette étude a permis d'accéder à des valeurs de constante d'affinité cohérentes avec celles reportées dans la littérature. La configuration consistant à injecter l'aptamère dans un électrolyte contenant la thrombine est apparue préférable du fait de ses nombreux avantages (profil électrophorétique plus simple, plus faible dispersion des valeurs de constante d'affinité obtenues via les différentes méthodes de linéarisation, limitation de la consommation d'aptamère). Nous avons dans un deuxième temps cherché à déterminer les

paramètres de l'interaction aptamère – lysozyme par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) et par analyse frontale électrocinétique continue (FACCE) en capillaire modifié. Afin de pallier les problèmes liés à la faible sensibilité de la détection UV, une nouvelle méthode basée sur l'analyse frontale électrocinétique en microsysteme (FACMCE, frontal analysis continuous microchip electrophoresis) avec détection de fluorescence a été développée pour la détermination simultanée, rapide et simple de la constante d'interaction et de la stoechiométrie d'un système. Les paramètres ont été déterminés à partir de la hauteur du plateau de l'aptamère libre, à l'aide de trois méthodes de linéarisation mathématique. Les résultats obtenus ont montré que l'interaction entre le lysozyme et son aptamère mettait en jeu deux sites d'affinité différente. Un faible rapport de concentration aptamère/protéine favorise les sites faibles, tandis qu'un rapport plus élevé induit une interaction plus intense et spécifique. L'étude a été poussée pour compléter les informations obtenues quant à l'influence des constituants du milieu sur la configuration de l'aptamère. Ainsi, différentes conditions expérimentales (nature de l'électrolyte de séparation, force ionique, présence d'un cation divalent, traitement thermique) ont été mises en œuvre. L'augmentation de la force ionique de l'électrolyte entraîne une diminution de la constante de dissociation, ce qui semble indiquer le caractère essentiellement non ionique de l'interaction aptamère/lysozyme ; en outre, une diminution du nombre de sites sur le lysozyme est observée, ce qui pourrait refléter un changement de mode de liaison et/ou une augmentation de la sélectivité. L'amélioration de l'affinité observée lors de l'ajout d'un cation divalent dans l'électrolyte pourrait être en partie liée à un changement conformationnel. La nature de l'électrolyte et du dication a également une influence sur les paramètres de l'interaction aptamère/lysozyme, ce qui est cohérent avec l'hypothèse de la formation de complexes binaires ou ternaires entre l'aptamère, le dication et le co-ion de l'électrolyte. Finalement, le chauffage préalable de la solution d'aptamère semble contribuer à la stabilisation de la conformation optimale de l'aptamère. Nous avons ainsi démontré l'intérêt de la FACMCE comme outil rapide et pertinent pour la détermination de paramètres d'interaction.

Enfin, nous avons démontré la faisabilité de l'emploi d'aptamères greffés sur des nanoparticules comme outils de bio-reconnaissance. Des nanoparticules magnétiques cœur/coquille de taille sub-nanométrique portant des chaînes polyéthylène glycol (PEG) et acide carboxylique ont été fonctionnalisées par l'aptamère anti-lysozyme modifié en 5' par un groupement amine primaire, via la formation d'une liaison amide. Les objets obtenus ont été caractérisés par électrophorèse capillaire de zone (CZE) en termes de taux de greffage, de

taille, de comportement électrophorétique et de stabilité colloïdale. Nous avons ensuite étudié l'interaction entre l'aptamère greffé sur les nanoparticules et sa cible, le lysozyme, afin de mettre en lumière l'influence de l'immobilisation de l'aptamère sur son affinité. L'étude par FACMCE, selon la procédure développée pour l'étude de l'interaction aptamère libre – lysozyme, de l'interaction aptamère greffé – lysozyme a conduit à des paramètres d'interaction similaires à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec l'aptamère libre marqué, permettant ainsi d'envisager l'utilisation future de ces objets comme outils de bio-reconnaissance moléculaire.

L'ensemble de ces résultats confirme l'intérêt que présente l'emploi d'aptamères des systèmes électrocinétiques. Simples d'utilisation et pouvant être aisément modifiés ou greffés sur des nanoparticules, ils présentent une affinité élevée pour leur cible, qu'ils soient libres en solution ou greffés. Les conditions opératoires, en particulier le milieu de séparation, semblent avoir une influence importante sur la conformation de l'aptamère, et ainsi sur son interaction avec la cible. Leur contrôle est donc nécessaire afin d'optimiser l'affinité de l'aptamère. Ces résultats permettent d'envisager l'intégration de ces nouveaux outils de bio-reconnaissance dans des systèmes miniaturisés, par exemple dans le cadre du diagnostic de l'allergie. De tels systèmes pourraient également être mis en œuvre pour la sélection d'aptamères, via le greffage de la cible sur des nanoparticules magnétiques.