THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE
ED 388

Spécialité : Chimie Analytique

Benjamin MADRU

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Développement d'un support d'extraction sélective à base d'aptamères : synthèse, caractérisation et application à des matrices complexes

Thèse dirigée par Mme Marie-Claire HENNION

Soutenue le 10 novembre 2010

Devant le jury composé de :

M Jean-Louis MARTY	Rapporteur
M Jean-Luc VEUTHEY	Rapporteur
M Éric PEYRIN	Examinateur
Mme Marie-Claire HENNION	Directrice de thèse
Mme Valérie PICHON	Examinateur
Mme Florence HUGON	Membre invité

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6
Bureau d'accueil, inscription des doctorants
Esc G, 2ème étage
15 rue de l'école de médecine
75270-PARIS CEDEX 06

Tél. Secrétariat : 01 44 27 28 10
Fax : 01 44 27 23 95
Tél. pour les étudiants de A à EL : 01 44 27 28 07
Tél. pour les étudiants de EM à MON : 01 44 27 28 05
Tél. pour les étudiants de MOO à Z : 01 44 27 28 02
E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

Remerciements

À madame le professeur Marie-Claire HENNION,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse.

Qu'il me soit permis de lui exprimer ici ma reconnaissance et mon profond respect.

À madame le professeur Valérie PICHON,

Qui m'a guidé dans la réalisation de cette thèse.

Pour la qualité de l'enseignement qu'elle a su me donner, et pour les opportunités qu'elle m'a offert de participer à de nombreux congrès.

En témoignage de ma profonde gratitude et de mon respectueux dévouement.

À madame Florence HUGON,

Pour ses précieux conseils et son aide lors de l'élaboration de ce travail.

Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de ma respectueuse considération.

À monsieur le professeur Jean-Louis MARTY, à monsieur le professeur Jean-Luc VEUTHEY, et à monsieur le professeur Eric PEYRIN,

Pour avoir accepté de juger ce travail.

Qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma reconnaissance.

À mademoiselle Aude du Boisbaudry,

Qui a contribué à ce travail de thèse lors de son stage de Master.

Qu'elle trouve ici le témoignage de ma sincère amitié.

À Valérie, Ramia, Annabelle, Wassim, Sonia, Charlotte, Youcef, Oussama, Bruno et à tous mes collègues du laboratoire,

Avec toute mon amitié et tout mon attachement.

À mes parents, mon frère, ma grand-mère, Marion, Flora, et mes amis,

Auprès de qui j'ai toujours trouvé le soutien et l'affection.

À Alice,

Pour son soutien permanent.

Envers qui mes pensées se sont tournées et se tourneront à chaque instant.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements **3**

TABLE DES MATIÈRES **7**

Résumé **11**

Abstract **13**

Liste des publications et des communications **15**

Introduction **19**

Chapitre 1 – Analyse de traces en milieu complexe ***23***

Chapitre 1 – Analyse de traces en milieu complexe **25**

I. Présentation des composés étudiés 25

A. La cocaïne 25

1. Origine, structure et mode d'action 25

2. Le métabolisme de la cocaïne 27

3. Les matrices biologiques d'intérêt 29

4. L'analyse chromatographique de la cocaïne 30

B. L'ochratoxine A 32

1. Origine, structure et mode d'action 32

2. L'analyse chromatographique de l'ochratoxine A 33

C. Conclusion 33

II. L'extraction sur phase solide 34

A. Principe 34

B. Méthode conventionnelle d'extraction sur phase solide 35

C. Paramètres clés de l'extraction sur phase solide 36

1. Le volume de fin de fixation 36

2. La capacité 37

D. Extraction en différé et extraction en ligne 38

1. Extraction en différé 38

2. Extraction en ligne 40

E. Les différents adsorbants utilisés 43

1. Les adsorbants polaires 43

2. Les adsorbants apolaires 44

3. Les échangeurs d'ions 44

4. Les supports mixtes 44

5. Limitations des supports conventionnels 45

6. Les supports biologiques à reconnaissance moléculaire : les immunoadsorbants 47

7. Supports biomimétiques à reconnaissance moléculaire : les polymères à empreintes moléculaires 50

F. Conclusion 52

Chapitre 2 – Les aptamères ***55***

Chapitre 2 – Les aptamères **57**

I. Structure des aptamères 57

A. La structure primaire 57

B. La structure secondaire 58

1. Les paires de bases 58

2. Les motifs structuraux 59

C. La structure tertiaire 61

D. Fixation d'un aptamère à sa cible 61

II. L'identification d'aptamères : le procédé SELEX 63

A. Principe général du procédé 63

B. Complexité de la bibliothèque d'oligonucléotides 64
C. Étape de sélection 65
D. Amplification des oligonucléotides sélectionnés 66
E. Optimisation de la séquence des aptamères sélectionnés 67
F. Modifications pré et post-SELEX 67
G. Automatisation et miniaturisation du procédé 68
H. Limitations de la procédure SELEX 69
III. Propriétés et caractéristiques des aptamères 69
A. La taille 69
B. L'affinité 70
C. La spécificité 71
D. Comparaison avec les anticorps 72
IV. Applications 74
A. Les applications thérapeutiques [131] 74
B. Les applications analytiques 75
1. Les biocapteurs ou « aptasensors » 75
2. Les bioessais à base d'aptamères 84
3. Les aptamères pour le diagnostic 89
4. Les méthodes séparatives 90
5. L'extraction sur phase solide 93

Chapitre 3 – Synthèse et caractérisation d'oligoadsorbants 99

Chapitre 3 – Synthèse et caractérisation d'oligoadsorbants 101
I. Présentation des aptamères étudiés 101
A. L'aptamère anti-cocaïne 101
B. L'aptamère anti-ochratoxine A 102
II. Supports d'immobilisation utilisés 103
III. Faisabilité de l'oligoextraction : caractérisation des oligoadsorbants anti-cocaïne synthétisés 105
A. Immobilisation sur de la sépharose activée thiol 106
B. Immobilisation sur de la silice activée glutaraldehyde 108
C. Immobilisation sur de l'agarose activée streptavidine 109
1. Développement de la procédure d'extraction : choix des conditions d'élution 109
2. Étude de stabilité 111
3. Capacité du support 112
4. Répétabilité de la synthèse 114
5. Conclusion 115
D. Immobilisation sur de la sepharose activée bromure de cyanogène 115
1. Evaluation de la rétention spécifique 115
2. Etude du volume de fin de fixation et développement de la procédure d'extraction 116
3. Capacité du support 120
4. Stabilité du support 122
5. Répétabilité de la synthèse 123
IV. Étude de l'influence de la longueur du bras espaceur 124
A. Influence sur la rétention non spécifique 125
B. Influence sur la rétention spécifique 126
C. Influence sur le greffage 127
1. Mise au point d'une méthode de dosage des aptamères 127
2. Étude du taux de greffage 129
D. Influence sur la capacité du support 130
E. Conclusions 131
V. Transposition des procédures de synthèse à l'oligoextraction de l'ochratoxine A 131
A. Immobilisation sur de l'agarose activée streptavidine 132
1. Volume de fin de fixation 132
2. Optimisation du protocole d'extraction 133
3. Capacité du support 134
B. Immobilisation sur de la sépharose activée bromure de cyanogène 135
1. Volume de fin de fixation 136
2. Protocole d'extraction 136
3. Capacité du support 137

C. Comparaison des oligoadsorbants 138
VI. Influence de la composition du tampon sur la rétention 139
A. Données sur l'influence des ions divalents sur l'aptamère anti-OTA 139
B. Étude de l'influence des ions divalents sur l'aptamère anti-cocaïne 140
C. Commentaires sur les évolutions de la procédure de synthèse 141
D. Discussion 142
VII. Conclusion 143

Chapitre 4 – Application des oligoadsorbants à des échantillons réels 147

Chapitre 4 – Application des oligoadsorbants à des échantillons réels 149
I. Oligoextraction de la cocaïne d'échantillons réels 149
A. Évaluation de la sélectivité du support 149
1. Particularités des aptamères constitués d'une jonction de trois tiges-boucles 149
2. Reconnaissance des métabolites de la cocaïne 151
3. Conclusions 153
B. Extraction de la cocaïne de fluides biologiques 154
1. Oligoextraction de la cocaïne de plasma et comparaison à la SPE conventionnelle 154
2. Développement de l'étape de précipitation des protéines 156
3. Oligoextraction de sang total 159
II. Oligoextraction de l'ochratoxine A du vin 162
A. Oligoadsorbant à base d'agarose activée streptavidine 162
B. Oligoextraction de vin sur le support à base de sepharose CNBr 163
1. Comparaison de l'oligoextraction à l'injection directe de vin 163
2. Optimisation de la procédure d'extraction 165
3. Comparaison à un support conventionnel et à un immunoadsorbant 166
III. Conclusion 168

Conclusion 171

Références bibliographiques 175

Annexes 187

Annexe 1 : Procédures d'immobilisation 188

Annexe 2 : Méthodes d'analyse chromatographique de la cocaïne 191

Annexe 3 : Analyse chromatographique de l'OTA 195

Annexe 4 : Méthode d'analyse chromatographique des aptamères 196

Annexe 5 : Détermination de la composition de la solution de neutralisation après précipitation des protéines par le TCA 197

Annexe 6 : Précipitation des protéines 198

Annexe 7 : Procédures d'extraction sur phase solide conventionnelle et d'immunoextraction de l'OTA 199

Liste des figures et des tableaux 201

Résumé

L'analyse de composés à l'état de traces dans des échantillons complexes tels que les fluides biologiques, les matrices environnementales ou les denrées alimentaires nécessite une étape de purification avant analyse afin de limiter la présence d'effets de matrice. Les supports conventionnels d'extraction sur phase solide, bien qu'étant très efficaces pour préconcentrer l'échantillon, conduisent souvent à la co-extraction de composés interférents. Afin de pallier ce manque de sélectivité, des supports sélectifs fondés sur des mécanismes de reconnaissance moléculaire ont été développés. Les immunoadsorbants, reposants sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'analyte et immobilisés sur un support solide, et les polymères à empreintes moléculaires qui possèdent des cavités spécifiques complémentaires d'une molécule empreinte, ont déjà démontré un fort potentiel pour l'extraction sélective de composés de matrices complexes.

Un troisième type de support d'extraction sélective également fondé sur un mécanisme de reconnaissance moléculaire exploitant les propriétés des aptamères a été développé lors de cette étude. Les aptamères sont des oligonucléotides capables de fixer de manière spécifique une molécule avec une affinité comparable à celle des anticorps.

Un aptamère sélectionné pour reconnaître la cocaïne a été choisi comme aptamère modèle pour cette étude de faisabilité. Différents supports d'immobilisation ont été évalués et les oligoadsorbants obtenus ont été caractérisés en termes de rétention spécifique et non spécifique, de taux de greffage, et de capacité. La sélectivité du support le plus performant en milieu pur a ensuite été évaluée en réalisant l'extraction de la cocaïne de plasma et de sang. L'analyse chromatographique des extraits obtenus a conduit à des chromatogrammes dépourvus de co-élutions, contrairement à ceux issus des traitements généralement employés, démontrant ainsi l'apport en purification de l'oligoextraction.

Ce développement a ensuite été transposé avec succès à un autre aptamère, l'aptamère anti-ochratoxine A. L'oligoadsorbant obtenu s'est montré très rétentif, du fait de sa forte affinité, et a permis l'extraction sélective de l'ochratoxine A du vin. Les résultats obtenus sont très similaires à ceux obtenus avec un immunoadsorbant. De plus, les procédures d'extraction s'avèrent beaucoup plus simples à développer que pour les polymères à empreintes moléculaires.

Abstract

The analysis of drugs in biological fluids (urine, plasma) at the trace level needs a sample clean-up before LC/MS analysis to limit the role of matrix effect. Despite their attractive features, classical sorbents used in Solid-Phase Extraction (SPE) often lead to the co-extraction of many interfering compounds. As an alternative to this lack of selectivity, selective materials based on a molecular recognition mechanism can be used. Immunosorbents (ISs) based on immobilized antibodies produced towards a target analyte, and molecularly imprinted polymers possessing specific cavities designed for a template molecule have already shown a high potential for the selective extraction of target analytes from complex matrices.

Selective extraction based on a molecular recognition mechanism can also be obtained using aptamers immobilized onto a solid support. Aptamers are oligonucleotides able to bind a specific molecule with the same affinity as antibodies. Aptamers are less expensive to produce and present a higher stability than antibodies.

An aptamer selected against cocaine was immobilized on various solid supports. These sorbents were characterized in terms of binding efficiency, specific and non specific retention as well as influence of the spacer length. To evaluate the ability of this oligosorbent to extract cocaine from complex samples, plasma and blood samples were treated by the support. The analysis of the samples treated by the oligosorbent led to a very clean chromatogram making the quantification of cocaine possible whereas peak co-elutions were observed when using conventional sample treatment techniques. This illustrated the improvement of the purification step by exploiting the high selectivity of aptamers.

An oligosorbent was then synthesized following the same procedure with another aptamer, selected against ochratoxin A. A high retention was observed on this sorbent and allowed the selective extraction of ochratoxine A from wine. Moreover, the extraction procedures are more simple and easier to develop than for the molecularly imprinted polymers.

Liste des publications et des communications

Liste des publications

"Determination of Cocaine in Human Plasma by Selective Solid-Phase Extraction Using an Aptamer-Based Sorbent", B. Madru, F. Chapuis-Hugon, E. Peyrin, et V. Pichon, Anal. Chem. 81 (2009) 7081.

"Oligosorbents design for the selective solid phase extraction of cocaine from postmortem blood", B. Madru, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, Article soumi.

Communications orales

Conférences présentées

B. Madru, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, "*Selective Extraction of Cocaine from Plasma by Solid Phase Extraction Supports Using Aptamers*", HTSP (Int. Symp. On Hyphenated Techniques for samples Preparation) – HTC 11 (Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyses), Bruges, Belgique, 26-29 janv. 2010. **Bourse offerte par le congrès HTSP.**

B. Madru, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, « *Extraction sélective de cocaïne de plasma humain : une alternative aux immunoadsorbants et aux polymères à empreintes moléculaires* », XVIIe congrès de la Société Française de Toxicologie Analytique, La Rochelle, 10-12 juin 2009.

B. Madru, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, « *Développement de supports d'extraction sélective sur phase solide à base d'aptamères* », Journée de l'école doctorale, Paris, 10 juin 2009.

Autres conférences

V. Pichon, B. Madru, S. Lordel, W. Hadj-Ali, V. Thibert, F. Chapuis-Hugon, *"Biological and biomimetic tools for sample preparation"* Extech 12, Advances in Extraction Technologies, Poznan, Pologne, Septembre 2010.

V. Pichon, B. Madru, V. Thibert, F. Chapuis-Hugon "*Aptamer-based sorbents as an alternative to immunosorbents and molecularly imprinted polymers for selective extraction of compounds from biological samples"*, Drug Analysis, Anvers, Belgique, Septembre 2010.

V. Pichon, B. Madru, V. Thibert, F. Chapuis-Hugon "*Oligosorbents, immunosorbents and molecularly imprinted polymers for the selective extraction of compounds from real samples"*, HSTP, International Symposium on Hyphenated Techniques for sample Preparation, 26-27 janvier 2010, Bruges.

V. Pichon, B. Madru, V. Thibert, A. Cingôz, F. Chapuis-Hugon, « *Extraction sélective de molécules à l'état de traces d'échantillons complexes : apport des anticorps, des aptamères et des polymères à empreintes moléculaires* », Journées « Analyse de traces et ultra-traces – Enjeux et perspectives », Société de BioChromatographie et Nanoséparation, Paris, 4 juin 2009.

V. Pichon, B. Madru, V. Thibert, F. Chapuis-Hugon, *"Selective extraction of a target analyte from complex samples by solid-phase extraction sorbents based on aptamers- Comparison with immunosorbents and molecularly imprinted polymers"* 2nd Pharmaceutical Sciences Fair – PharmSciFair 2009, 8-12 juin, Nice.

V. Pichon, B. Madru, V. Thibert, F. Chapuis-Hugon, "*Selective extraction of a target analyte from complex samples by solid-phase extraction sorbents based on aptamers – Comparison with immunosorbents and molecularly imprinted polymers"*, HPLC 2009, 34th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Dresde, Allemagne 28 juin-2 juillet 2009.

V. Pichon, B.Madru, F. Chapuis-Hugon, "*Selective extraction using biological and chemical approaches for the trace analysis in complex matrices: potential of antibodies, aptamers and molecularly imprinted polymers"*, ISC 08-27th International symposium on Chromatography, 21-25 sept. Munster, Allemagne.

F. Chapuis-Hugon, B. Madru, A. Cingöz, V. Thibert, V. Pichon, « *Utilisation d'outils sélectifs pour l'analyse de traces dans des échantillons complexes »*, SEP 09, Congrès de Chromatographie et techniques apparentées, Marseille, 30 nov-3 dec. 09.

Communication par affiche

B. Madru, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, *"Evaluation of aptamer-based sorbents for selective solid phase extraction"*, HTSP (Int. Symp. On Hyphenated Techniques for samples Preparation) – HTC 11 (Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyses), Bruges, Belgique, 26-29 janv. 2010. **Prix Poster.**

B. Madru, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, *"Selective extraction of cocaine from plasma by solid phase extraction supports using aptamers"*, HPLC 2009, 34th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Dresde, Allemagne 28 juin-2 juillet 2009. **Bourse offerte par l'AFSEP.**

B. Madru, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, *"Selective extraction of cocaine by solid phase extraction supports using aptamers"*, ISC 08- 27th International symposium on Chromatography, 21-25 sept. Munster, Allemagne. **Prix Poster.**

B. Madru, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, *« Développement de supports sélectifs d'extraction sur phase solide à base d'aptamères pour l'analyse de la cocaïne »*, Journée de l'école doctorale, Paris.

F. Chapuis-Hugon, B. Madru, V. Pichon, "Aptamer-based selective extraction for the determination of cocaine in post-mortem blood", Drug Analysis, Anvers, Belgique, Septembre 2010.

Introduction

Quel que soit le domaine d'application (clinique, agroalimentaire ou environnemental), les difficultés rencontrées en chimie analytique sont très souvent liées aux faibles teneurs recherchées et à la complexité de certains échantillons. L'instrumentation a connu de nombreux développements technologiques, notamment dans les domaines des séparations rapides et de la détection par spectrométrie de masse. L'étape de traitement de l'échantillon est souvent laissée en retrait, alors qu'elle représente la deuxième plus importante source d'erreurs de toute la méthode analytique après l'échantillonnage et que l'analyste lui consacre 60 % de son temps. Cette technique permet pourtant d'augmenter grandement les performances de la méthode analytique en concentrant les analytes et en purifiant l'échantillon afin de s'affranchir d'éventuels effets de matrice.

L'extraction liquide-liquide a longtemps été la méthode la plus couramment employée. Cette technique est cependant sujette à la formation d'émulsions et les rendements d'extraction des composés polaires sont faibles. Le développement de nouvelles phases stationnaires ainsi que la mise en place de réglementations sur la réduction de l'usage de solvants organiques ont contribué à son remplacement progressif au profit de l'extraction sur phase solide. De nombreux adsorbants tels que les silices greffées ou les phases polymériques ont été développés et ont montré un fort potentiel de préconcentration. Toutefois, la rétention de ces supports est uniquement basée sur l'établissement d'effets hydrophobes, de nombreux composés interférents de polarité voisine à celle des analytes sont co-extraits lors du traitement d'échantillons complexes, ce qui peut engendrer des erreurs et effets de matrice. Afin de pallier ce manque de purification, des supports sélectifs fondés sur des mécanismes de reconnaissance moléculaire ont été développés. Ces supports d'extraction sélective sur phase solide permettent d'obtenir un extrait dépourvu d'interférents en une seule extraction.

La première approche consiste en l'utilisation d'immunoadsorbants. Ces adsorbants sont constitués d'anticorps développés contre l'analyte cible et immobilisés sur un support solide. La grande affinité et spécificité de la liaison antigène/anticorps permet de retenir uniquement le ou les composés reconnus par les anticorps. Après une étape de lavage, les composés sont élués et un extrait contenant uniquement les molécules d'intérêt est collecté. Néanmoins, leur manque de stabilité et le coût de revient sont leurs principaux inconvénients.

Une autre stratégie, aujourd'hui largement employée, est l'utilisation de polymères à empreintes moléculaires (*MIP, Molecularly Imprinted Polymers*). Ces polymères possèdent des cavités ayant une complémentarité stérique et fonctionnelle à la molécule cible. Lors de la percolation de l'échantillon, leurs cavités retiennent uniquement et de manière spécifique les molécules d'intérêts, et les composés interférents sont ainsi éliminés. La synthèse de ce type d'adsorbant est rapide et relativement simple. Cependant, celle-ci peut s'avérer couteuse lorsqu'il s'agit de molécules naturelles dont le coût de synthèse est élevé. D'autre part, des problèmes de relargage de la molécule empreinte utilisée lors de la synthèse peuvent également survenir, pouvant ainsi fausser la quantification.

Une nouvelle classe de molécules, nommées aptamères, est de plus en plus employée comme outil de reconnaissance moléculaire dans diverses applications analytiques. Les aptamères sont des oligonucléotides de longueur le plus souvent comprise entre 20 et 60 bases et qui possèdent une forte affinité et spécificité envers un ligand (petites molécules organiques, peptides, acides nucléiques, protéines, cellules intactes). Ils sont sélectionnés à partir d'une banque aléatoire contenant jusqu'à 10^{15} séquences différentes par une méthode combinatoire de sélection in vitro appelée *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX)* selon leur aptitude à reconnaître une cible. Leur affinité, comparable à celle des anticorps, leur confère un grand potentiel pour diverses applications analytiques comme des bioessais de type ELISA (appelés ELONA pour *enzyme-linked oligonucleotide assay*), des biocapteurs ou encore des phases stationnaires utilisées en chromatographie d'affinité, en électrochromatographie, ou en MALDI.

L'objectif de ce travail est d'étudier la faisabilité de l'utilisation d'une phase stationnaire à base d'aptamères, appelée oligoadsorbant, pour l'extraction sélective sur phase solide. En effet, très peu d'études portent sur l'utilisation d'aptamères pour l'extraction sur phase solide en tant que telle. L'oligoextraction semble être une alternative intéressante à l'immunoextraction et présenterait même quelques avantages. En effet, la petite taille des aptamères comparée à celle des anticorps permettrait une meilleure densité de greffage, et donc des supports de plus grande capacité. En plus de leur facilité de synthèse, les aptamères ont des durées de renaturation de quelques minutes contre 24 ou 48h pour les anticorps. Les oligoadsorbants peuvent également concurrencer les MIP lorsque la molécule cible est particulièrement chère car leur sélection nécessite une quantité beaucoup moins élevée d'analyte.

L'aptamère anti-cocaïne a été tout d'abord choisi comme aptamère modèle pour la synthèse d'un oligoadsorbant. Différents supports d'immobilisation ont été

évalués et les oligoadsorbants obtenus ont été caractérisés. La sélectivité du support le plus performant en milieu pur a ensuite été évaluée en réalisant l'extraction de cocaïne de plasma et de sang. Ces développements ont ensuite été transposés à un autre aptamère, l'aptamère anti-ochratoxine A, afin de vérifier que les procédures mises au point sont applicables aux autres aptamères.

Chapitre 1 – Analyse de traces en milieu complexe

Chapitre 1 – Analyse de traces en milieu complexe

La première partie de ce chapitre est consacrée à la présentation des deux molécules prises comme modèles pour notre étude : la cocaïne et l'ochratoxine A. Leurs propriétés ainsi que les méthodes d'analyses mises en jeu pour leur détection seront discutées. Nous verrons que ces molécules sont présentes dans des matrices très complexes, qui nécessitent souvent une étape de traitement de l'échantillon avant analyse.

La seconde partie présente la méthode de traitement de l'échantillon la plus employée lors de l'analyse de composés à l'état de traces dans des échantillons complexes : l'extraction sur phase solide. Une attention particulière sera ensuite portée sur les supports d'extraction basés sur des mécanismes de reconnaissance moléculaire.

I. Présentation des composés étudiés

A. La cocaïne

1. Origine, structure et mode d'action

La cocaïne est un alcaloïde extrait de l'*Erythroxylum Coca*, plante couramment appelée coca et répandue au Pérou et en Bolivie. Psychotrope classé comme stupéfiant, la cocaïne est une drogue puissante qui stimule le système nerveux central. Plusieurs preuves archéologiques, dont la découverte de restes de feuilles de coca dans des tombes datant du VII^{ème} siècle au Pérou et en Bolivie, montrent que la cocaïne était consommée par les peuples amérindiens. Les feuilles de coca étaient mâchées probablement pour augmenter les performances physiques ainsi que pour lutter contre la faim et la fatigue. Des produits à base d'extraits de feuilles de coca ont fait leur apparition à la fin du XIX^{ème} siècle pour des utilisations très diverses : anesthésiant local, produit dopant, traitement de la dépression ou même de certaines addictions. L'usage récréatif se développe et les cas de

cocaïnisme se multiplient, une réglementation de l'usage et de la distribution de la cocaïne a donc été mise en place pour la première fois aux États Unis en 1914.

La cocaïne, dont la structure chimique est présentée en Figure 1A, possède une fonction amine ionisable dont le pKa est 8,6 [1], et le logarithme de son coefficient de partage octanol/eau est de 2,43 [2]. Elle peut se présenter sous deux formes différentes (Figure 1 B et C) :

- le chlorhydrate de cocaïne : une poudre blanche hydrosoluble qui peut-être insufflée (« sniffée »), fumée, ou injectée par voie intraveineuse après avoir été dissoute dans l'eau,
- le crack : cocaïne sous sa forme basique (freebase) qui est généralement fumée.



Figure 1 : (A) : Structure de la cocaïne ; (B) : Chlorhydrate de cocaïne ; (C) : « Crack »

La durée des effets, liée à l'évolution de la concentration de cocaïne dans le sang, diffère quelque peu en fonction de la forme sous laquelle elle a été consommée. Lorsqu'elle est insufflée, la cocaïne produit son effet après 3 minutes environ, tandis que ce dernier se manifeste en quelques secondes lorsqu'elle est fumée ou injectée. Dans le cas où la cocaïne est insufflée, la phase d'euphorie dure en moyenne 30 minutes, contre 5 à 10 minutes si elle est fumée et moins encore si elle est injectée.

Elle agit sur le système nerveux central en bloquant la recapture de dopamine dans l'espace synaptique comme l'illustre la figure 2. Ce neurotransmetteur, libéré pendant la transmission de l'influx nerveux, est normalement réabsorbé par le neurone émetteur via des protéines de transport. La cocaïne se fixant sur ces protéines de transport, elle entraîne l'accumulation de dopamine dans l'espace synaptique, ce qui a pour effet d'amplifier et de prolonger la transmission du signal nerveux provoquant un effet stimulant.

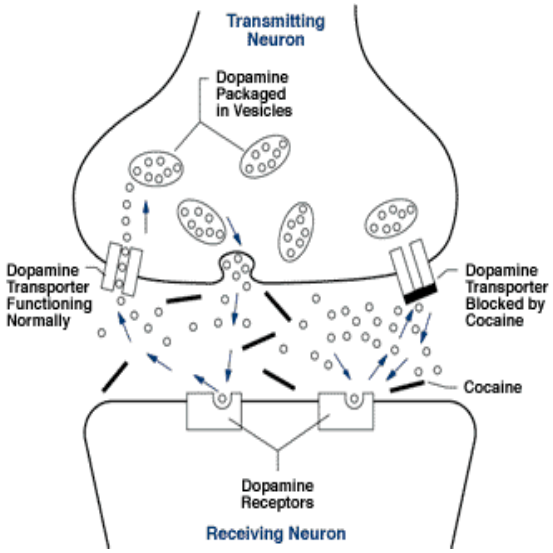


Figure 2 : Transmission de l'influx nerveux en absence et en présence de cocaïne [3]

La prise de cocaïne engendre une augmentation du rythme cardiaque, de la pression artérielle, de la température corporelle et de la fréquence respiratoire. Les pupilles se dilatent et les sensations de faim et de sommeil disparaissent. Une consommation de fortes doses, un état de santé fragile, ou un mélange avec d'autres substances aggravantes peuvent causer la mort. En plus de sa toxicité intrinsèque, une interaction avec un produit de coupe peut en accroître les dangers. En effet, la cocaïne est la plupart du temps diluée (ou « coupée ») avec d'autres produits stimulants ou anesthésiants moins couteux (comme la lidocaïne, la procaïne, la benzocaïne, la caféine ou l'éphédrine) ayant des effets proches de ceux provoqués par la cocaïne pour tromper les consommateurs. Le coupage avec des sucres (lactose, saccharose, mannitol…) est également fréquent afin de conserver le même aspect à moindre coût.

2. Le métabolisme de la cocaïne

La cocaïne se transforme très rapidement dans l'organisme, sa demi-vie dans le sang est évaluée entre 31 et 80 minutes [4]. Le schéma du métabolisme de la cocaïne est présenté en Figure 3.

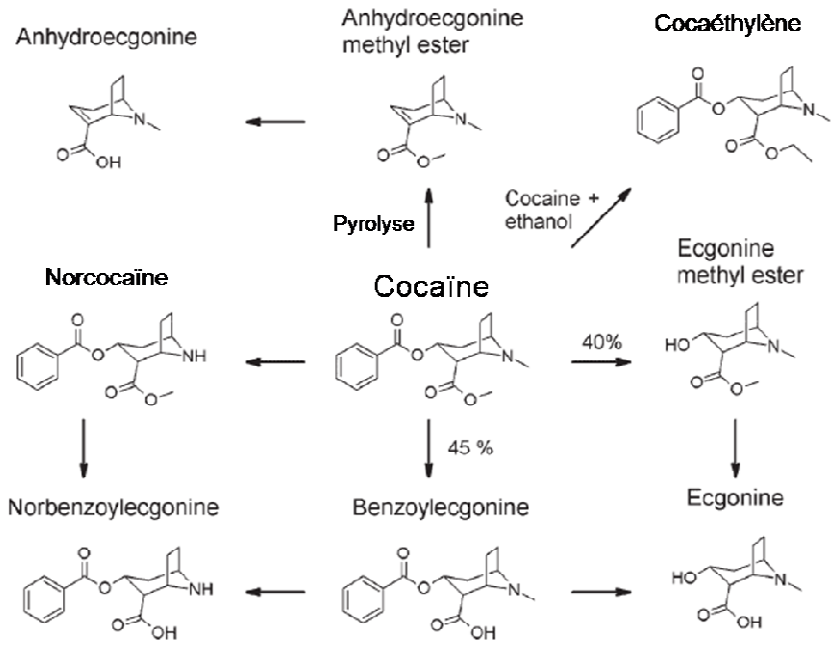


Figure 3 : Schéma du métabolisme de la cocaïne. Adapté de [5]

La benzoylecgonine (BZE) en est son métabolite principal. Elle résulte de la cassure de la liaison methyl-ester à la fois par voie non enzymatique pour 20 % de la benzoylecgonine formée, via un mécanisme d'hydrolyse basique, et par voie enzymatique catalysée par des estérases pour les 80 % restants [4]. Bien que ce métabolite soit inactif d'un point de vue pharmacologique, il est d'un grand intérêt médico-légal et analytique de par sa longue demi-vie évaluée entre 2,6 et 5,1 heures dans le plasma et 7,5 heures dans les urines [6]. Le second métabolite majeur de la cocaïne est l'ecgonine methyl ester (EME), produit par hydrolyse enzymatique de l'ester de benzyle. Il est établi qu'environ 45% de la cocaïne consommée est métabolisée en benzoylecgonine et 40% en ecgonine methyl ester [5]. Ces deux métabolites sont ensuite hydrolysés en ecgonine. La norcocaïne est formée par N-démethylation de la cocaïne. Elle est le premier métabolite ayant une activité pharmacologique. La norbenzoylecgonine est obtenue par le même mécanisme à partir de la benzoylecgonine, mais aussi par hydrolyse de la norcocaïne. D'autres métabolites sont très intéressants d'un point de vue médico-légal, car ils donnent des informations sur la façon selon laquelle la cocaïne a été consommée. Quand de l'alcool a été ingéré simultanément à la prise de cocaïne, le cocaéthylène (composé toxique résultant de la transestérification de la cocaïne en présence d'éthanol) est retrouvé. L'anhydroecgonine methylester et son produit de dégradation l'anhydroecgonine sont quant à eux des produits de pyrolyse de la cocaïne, synonyme de consommation de cocaïne fumée sous forme de crack [7].

3. Les matrices biologiques d’intérêt

L’analyse de la cocaïne et de ses métabolites dans les matrices biologiques est très complexe du fait de leur courte demi-vie. Leur recherche dans le sang, le plasma ou le sérum est très répandue. La durée de détection de la cocaïne y est estimée entre 4 et 6 heures, alors que la benzoylecgonine peut être détectée jusqu’à 48 heures après la prise [8]. Même si le sang n’offre pas la plus longue fenêtre de détection, ce milieu biologique est très intéressant car il permet la meilleure interprétation du degré d'influence de la cocaïne sur le comportement. De plus, le dosage sanguin matérialise de façon indiscutable une consommation récente de stupéfiants. De plus, le sang, contrairement à l'urine, n'est pas adultérable [9].

L’urine reste cependant la matrice dans laquelle la cocaïne est le plus souvent recherchée. Ce milieu biologique présente l’intérêt d’être non invasif, disponible en grande quantité et facile à prélever. La benzoylecgonine y est détectable jusqu’à trois jours après une prise. La cocaïne quant à elle, n’y est présente qu’en très faible quantité, entre 1 et 9 % de la dose consommée [5]. Cependant, l’urine est le type d’échantillon le plus souvent falsifié. En effet, de nombreux moyens peuvent être mis en œuvre pour falsifier les tests de dépistage urinaire [10] : la dilution (rajout d’un liquide à l'urine émise au moment du recueil), la substitution (par le biais d'un réservoir souple dissimulé sur le corps contenant de l'urine exempte de drogue), l'adultération in vitro (ajout d'une substance sur l'urine émise) ou in vivo (absorption avant le prélèvement urinaire d’une substance médicamenteuse).

L’analyse des cheveux a pris beaucoup d’importance ces dernières années pour la recherche de stupéfiants. La cocaïne est le composé majoritairement présent, elle représente entre 50 et 80% des cocaïniques retrouvés dans les cheveux [11]. Cette matrice est non invasive, difficilement falsifiable et peut être stockée ou transportée sans précaution particulière de par sa grande stabilité. Elle offre la fenêtre de détection la plus longue grâce à la grande stabilité de la cocaïne et de ses métabolites une fois incorporés dans les cheveux. Il a ainsi été possible d’identifier de la cocaïne dans les cheveux de momies péruviennes, vieilles de plusieurs centaines d’années [12]. En outre, sachant que le cheveu pousse environ d’un centimètre par mois, il est possible d’établir une évolution de la consommation mois après mois. Les interprétations sont cependant délicates sachant que la vitesse de croissance du cheveu n’est pas rigoureusement constante et que des phénomènes de migration à l’intérieur du cheveu sont possibles. De plus, certains traitements cosmétiques peuvent affecter les analyses. Une diminution de 60 à 70 % du contenu en cocaïne et de ses métabolites est observée dans les mèches de cheveux décolorés

par rapport aux cheveux de couleur naturelle de la même personne [12]. Il est également à noter qu'ils ne permettent pas de détecter un usage récent.

Une autre matrice alternative non invasive est la salive. Différentes voies d'administration font apparaître rapidement la cocaïne dans la salive. La contamination de la cavité buccale suite à une consommation sous forme fumée ou insufflée est variable mais significative durant les premières heures consécutives à l'administration d'une dose unique ; la concentration salivaire en cocaïne représente 4 à 5 fois la concentration plasmatique [13]. Typiquement, la concentration de cocaïne est supérieure à celle des métabolites durant les deux premières heures, elle décline ensuite rapidement à des concentrations parfois inférieures à celles des métabolites dans les 4 à 6 heures [14]. Cette matrice s'avère donc intéressante pour détecter une consommation récente.

La présence de stupéfiants peut également être recherchée dans la sueur. L'échantillon est recueilli la plupart du temps sur un patch porté par l'individu pendant 5 à 10 jours. Les drogues diffusent de manière passive du sang vers les glandes sudoripares. En ce qui concerne la recherche de cocaïniques, la cocaïne est la molécule majoritairement extraite par le patch [15]. La benzoylecgonine est également présente à des concentrations correspondant environ à 10 % de celle de la cocaïne. La fenêtre de détection est intéressante puisqu'elle permet de savoir si de la cocaïne a été consommée pendant le port du patch, soit une semaine en moyenne.

D'autres matrices plus marginales sont analysées comme le méconium, premières selles d'un nouveau né, utile pour évaluer le degré d'exposition du fœtus durant la grossesse [16], les ongles pouvant proposer une alternative aux cheveux [17], ou encore, la bile ou le corps vitré [18] pour les analyses post mortem.

Concernant les matrices environnementales, les concentrations de cocaïne et de ses métabolites peuvent être mesurées dans les eaux usées et dans les eaux de surfaces afin d'évaluer la consommation collective d'une ville ou d'une région [5,19-21].

4. L'analyse chromatographique de la cocaïne

Selon un arrêté datant de 2001, les seuils de détections légaux des cocaïniques dans le sang et l'urine sont respectivement de 50 et 300 ng/mL [9].

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) était la méthode la plus populaire jusqu'il y a une dizaine d'années environ. Sa grande sensibilité ainsi que la facilité de son couplage avec la spectrométrie de masse ont fait de cette méthode un outil très performant. Elle reste encore très utilisée pour la recherche de cocaïne

dans différentes matrices biologiques [7,17,18,22-24]. Bien que les détecteurs par ionisation de flamme (FID) [18] ou azote/phosphore (NPD) [25] puissent être employés, la spectrométrie de masse est de loin le détecteur le plus souvent associé à la CPG [6]. Cependant, la CPG n'est pas directement applicable aux métabolites de la cocaïne de par leur faible volatilité ; une dérivation préalable est nécessaire. La chromatographie en phase liquide (CPL), quant à elle, peut séparer une gamme de polarités plus large de composés sans dérivation. Cette technique a connu un important essor notamment grâce aux progrès de son couplage avec la spectrométrie de masse.

L'analyse des cocaïniques par CPL est très majoritairement réalisée par partage à polarité de phases inversée. Une détection par absorbance ultraviolet [26-35] ou par fluorescence [36,37] est possible pour une majorité des métabolites, excepté pour ceux ayant perdu le chromophore ester de benzyle : l'ecgonine methyl ester, l'ecgonine, l'anhydroecgonine methyl ester et l'anhydroecgonine. Cependant, le couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse en tandem est devenue la méthode de choix pour atteindre les sensibilités permettant la détection de faibles concentrations dans des matrices biologiques complexes [11,38-42]. L'apport en spécificité de cette méthode est aussi devenu essentiel étant donné le degré de certitude demandé dans l'identification et la quantification des composés dans le domaine médico-légal. L'agence mondiale anti-dopage (AMA) a imposé des règles concernant le nombre d'ions d'identification et les limites d'acceptabilité des intensités relatives de ces ions [43]. Au moins trois ions diagnostiques (dont un ion de quantification) doivent être présents avec des rapports signal-sur-bruit supérieurs à 3. Les rapports d'intensité entre ces ions doivent se trouver dans des limites strictes définies par l'AMA. Même si la spécificité de ce détecteur améliore considérablement la fiabilité des résultats, les étapes de traitement de l'échantillon ou de séparation chromatographique ne doivent pas être négligées au risque de provoquer la co-élution de composés possédant le même fragment ou la même transition en spectrométrie de masse [44].

Le développement et la démocratisation de la chromatographie liquide à ultra haute performance (ou UHPLC) ont permis l'emploi de cette technique pour le screening de substances illicites dans des échantillons biologiques [2,45-49]. L'utilisation de fines particules, dont le diamètre est inférieur à 2 microns, permet en effet d'accélérer la séparation sans pour autant nuire aux performances chromatographiques.

B. L’ochratoxine A

1. Origine, structure et mode d’action

L’ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine produite par des moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium*, et peut contaminer différentes denrées alimentaires principalement pendant leur stockage mais aussi pendant leur culture. On la retrouve dans les céréales [12,50,51], le vin [52,53], les graines de café [54-56], les fèves de cacao [57] et même dans le lait et les viandes si les animaux ont été exposés à une alimentation contaminée par l’ochratoxine. Sa structure est représentée en figure 4.

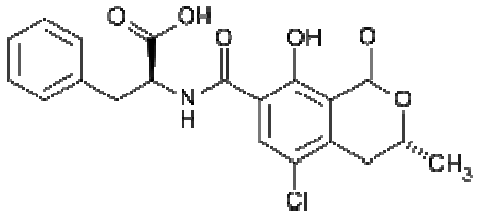


Figure 4 : Structure de l’ochratoxine A

Elle possède des propriétés acides (pKa_1=4,2-4,4 et pKa_2=7,0-7,3 respectivement pour le groupement carboxyle et la fonction hydroxyle du groupement phénolique [58]) et le log P de l’ochratoxine est estimé à 4,61 [59].

La source principale de contamination chez l’homme se fait par ingestion de produits céréaliers. En effet, l’ochratoxine est un composé très stable qui ne se dégrade que très peu durant le stockage, la transformation et même la cuisson des céréales [60]. Une seconde source d’intoxication, qui touche les manutentionnaires, peut être l’inhalation de particules de céréales contaminées en suspension dans l’air pendant leur stockage, leur manipulation, leur transfert et leur emballage [20,61-63]. La faible solubilité de l’ochratoxine dans l’eau entraîne une bioaccumulation dans l’organisme. Une fois ingérée, elle s’accumule dans le rein, le foie, les tissus adipeux et les muscles. Les études de toxicité montrent que l’organe cible est le rein : pour chaque espèce animale étudiée, l’exposition à l’OTA s’est traduite par une néphropathie caractérisée par une altération de la fonction rénale [58]. Elle est également génotoxique, tératogène, immunotoxique, neurotoxique, et peut être cancérigène pour l’homme selon le Centre International de Recherche sur le Cancer [64,65]. Chez l'homme, l’OTA a été incriminée dans une pathologie rénale chronique décrite dans les pays d’Europe de l’Est : la néphropathie endémique des Balkans.

2. L'analyse chromatographique de l'ochratoxine A

Pour limiter l'exposition humaine et animale à cette toxine, l'Union Européenne a fixé des concentrations limites dans certains aliments : 5 $\mu g.kg^{-1}$ pour les céréales et le café torréfié, 10 $\mu g.kg^{-1}$ pour le café instantané, 2 $\mu g.kg^{-1}$ pour les produits dérivés du raisin comme le vin ou les raisins secs, 3 $\mu g.kg^{-1}$ pour les produits dérivés des céréales et 0,5 $\mu g.kg^{-1}$ pour les aliments pour enfants. Des méthodes analytiques ont donc été développées pour la quantification de l'OTA dans ces denrées alimentaires mais aussi dans des matrices biologiques, comme le plasma sanguin [64] ou l'urine [66], pour déterminer le degré d'exposition d'un individu.

La méthode couramment utilisée est la chromatographie liquide de partage à polarité de phases inversées [67]. Le mode de détection le plus fréquemment choisi pour sa grande sensibilité et sa spécificité est la fluorescence [68]. Elle permet d'atteindre des limites de détection dans le vin de l'ordre de la dizaine de ppt, et ce sans que l'étape d'extraction ne concentre l'échantillon [69]. Cette méthode a aussi permis de mettre en évidence une contamination par l'OTA dans des échantillons tels que les figues séchées [70], le riz [71], le café [72] et le sang humain [73]. La détection par spectrométrie de masse est de plus en plus utilisée pour sa grande spécificité et son fort pouvoir d'identification [74-78]. Cependant, une étape de purification de l'échantillon avant injection est souvent requise, afin de s'affranchir des effets de matrices et de protéger la colonne chromatographique [67].

C. Conclusion

Les milieux dans lesquels se retrouvent ces deux molécules sont très complexes, de nombreux composés interférents peuvent ainsi perturber leur analyse. L'exemple le plus manifeste est la suppression ou l'amplification de signal en spectrométrie de masse, causées par la co-élution de composés non volatils, ou possédant une forte affinité protonique ou formant des paires d'ions avec l'analyte [79,80]. Étant données les faibles teneurs rencontrées et la complexité des matrices, leur analyse chromatographique nécessite d'associer aux étapes de séparation et de détection une étape de traitement de l'échantillon visant à extraire et concentrer les analytes, tout en limitant la présence de composés interférents.

II. L’extraction sur phase solide

Le développement d’une méthode analytique complète comprend de nombreuses étapes, depuis le prélèvement de l’échantillon jusqu’au traitement des données : la préparation de l’échantillon, la séparation des analytes, leur identification et enfin la quantification. De nombreux développements technologiques ont conduit à la mise à disposition d’instruments sophistiqués essentiellement dédiés à la séparation et la détection, laissant légèrement en retrait le traitement de l’échantillon. Pourtant, cette étape est considérée comme étant la plus longue, la plus fastidieuse et représentant la plus importante source d’erreurs de toute la méthode analytique. Les principaux objectifs de la préparation de l’échantillon, pour une analyse chromatographique, sont l’élimination d’un maximum de composés interférents ainsi que la concentration des analytes, surtout dans le cas d’analyses de traces. Cette étape peut aussi permettre le transfert des analytes dans un solvant plus adapté à l’analyse, ou même fractionner l’échantillon en plusieurs groupes de composés. L’extraction liquide-liquide *(Liquid-Liquid Extraction, LLE)*, basée sur la distribution d’un soluté entre deux phases liquides en fonction de son affinité pour chacune d’elles, a longtemps été la méthode la plus couramment employée bien que présentant quelques inconvénients. En effet, même si elle est simple et efficace, c’est une technique longue et fastidieuse. Elle nécessite des quantités importantes de solvants organiques toxiques ou inflammables, elle est sujette aux problèmes liés à la formation d’émulsions, elle est peu efficace pour l’extraction de composés organiques polaires et est difficilement automatisable lorsqu’elle est appliquée à des échantillons de grand volume. Les réglementations sur la réduction de l’usage de solvants organiques ainsi que le développement de nouvelles phases stationnaires ont participé à l’émergence de l’extraction sur phase solide *(Solid-Phase Extraction, SPE)*, technique d’extraction la plus répandue aujourd’hui.

A. Principe

L’extraction sur phase solide est fondée sur le transfert des composés à extraire d’une phase liquide, l’échantillon, vers une phase solide, l’adsorbant. Les analytes doivent présenter une forte affinité pour la phase solide afin d’être retenus pendant l’étape de percolation de l’échantillon. Ils pourront ensuite être désorbés par un solvant de forte force éluante. A l’image de ceux mis en jeu en chromatographie en phase liquide, les mécanismes de rétention ou d’élution sont basés sur les

différences d'interactions moléculaires entre l'analyte, le site actif de l'adsorbant et la phase liquide. Dans ce chapitre, les techniques d'extraction sur phase solide non exhaustives, comme la micro-extraction sur phase solide (SPME), l'extraction dynamique sur phase solide (SPDE) ou la micro-extraction sur barreau (SBSE) ne seront pas discutées. Ces techniques sont basées sur un partage des analytes entre l'adsorbant et l'échantillon entraînant donc une extraction non exhaustive des composés. Les fondements théoriques sont par conséquent différents de ceux présentés ici.

B. Méthode conventionnelle d'extraction sur phase solide

Le format le plus couramment rencontré consiste à placer l'adsorbant entre deux frittés dans une cartouche, les différentes solutions sont percolées par simple gravité, par pression positive à l'entrée de la cartouche, par vide en sortie de la cartouche, ou par centrifugation. Un protocole d'extraction sur phase solide est généralement constitué de quatre étapes, comme illustré sur la figure 5.

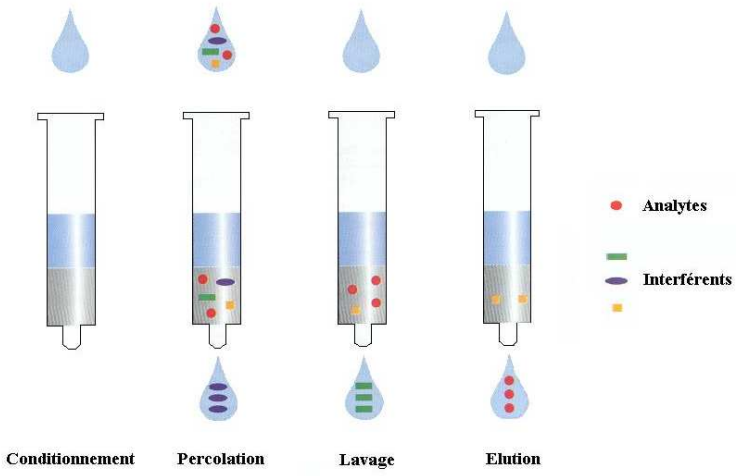


Figure 5 : Protocole d'extraction sur phase solide. [81]

La première étape, appelée conditionnement, a pour objectif de mouiller et d'activer l'adsorbant afin de le préparer au passage de l'échantillon contenant les solutés à extraire. Elle doit idéalement s'achever par le passage d'une solution de composition, et donc de force éluante, très similaire à celle de l'échantillon pour éviter tout risque d'élution anticipée des analytes ciblés. Lors de la seconde étape, on procède à la percolation de l'échantillon sur le support. Les analytes, ayant une grande affinité pour l'adsorbant choisi, sont fortement retenus contrairement à

certains composés interférents pouvant déjà être éliminés lors de cette étape. Cependant, certaines substances interférentes peuvent également être adsorbées sur le support. Une étape de lavage est donc nécessaire. Elle consiste à utiliser une solution peu éluante vis-à-vis des analytes d'intérêt afin de ne pas les perdre tout en éliminant un maximum des composés interférents plus faiblement retenus. Enfin, les analytes sont désorbés avec un faible volume d'une solution de forte force éluante. Une grande partie des interférents ayant été éliminée lors des étapes de percolation et de lavage, la fraction ainsi obtenue a donc été purifiée. Le rendement d'extraction peut ensuite être déterminé en calculant le rapport entre la quantité de soluté retrouvée dans la fraction d'élution et la quantité percolée. En plus de la purification, cette étape d'extraction permet de concentrer les analytes d'un facteur (appelé facteur d'enrichissement) défini selon l'équation suivante :

$$\text{facteur d'enrichissement} = \frac{\text{Volume percolé}}{\text{Volume d'élution}} \times \text{rendement d'extraction}$$

C. Paramètres clés de l'extraction sur phase solide

L'adsorbant doit tout d'abord être choisi en fonction de la nature de l'échantillon, de sorte à développer une forte rétention des analytes. La force éluante du solvant constituant l'échantillon, devant être faible vis-à-vis de l'adsorbant choisi. Un exemple très fréquent est l'utilisation d'adsorbants hydrophobes pour l'extraction de composés dans des échantillons aqueux. La totalité des composés d'intérêts percolés doivent rester fixés sur le support durant les étapes de percolation et de lavage, ce qui implique de tenir compte du volume de fin de fixation et de la capacité du support.

1. Le volume de fin de fixation

Si l'adsorbant est suffisamment rétentif, la quantité d'analyte fixée augmentera proportionnellement au volume d'échantillon percolé, améliorant ainsi, pour un même volume d'élution, le facteur d'enrichissement. Cependant, à partir d'un certain volume, les solutés finiront par être élués par le solvant qui constitue l'échantillon. Ce volume est appelé volume de fin de fixation V_f (ou volume de fuite) et est généralement défini au point où la concentration de l'analyte en sortie de cartouche représente 1% de la concentration percolée. Si les solutions de percolation et de lavage sont de même composition, la somme de ces deux volumes doit

impérativement être inférieure au volume de fin de fixation pour obtenir un rendement d'extraction de 100%. Dans le cas d'utilisation d'une solution de lavage plus éluante que la solution de percolation, le volume de fin de fixation diminue. Il faudra alors s'assurer que les volumes choisis n'entraînent pas d'élution anticipée de l'analyte. Sa détermination s'effectue le plus souvent de façon expérimentale en augmentant progressivement les volumes des fractions, tout en maintenant la quantité percolée constante jusqu'à observer une élution de l'analyte.

Les choix respectifs des volumes de percolation et de lavage sont guidés par l'objectif de l'étape d'extraction sur phase solide. Si l'objectif premier est de préconcentrer l'analyte présent en quantité très faible dans l'échantillon, on privilégiera un volume de percolation élevé, et donc un volume de lavage faible. En revanche, si l'analyte est présent dans une matrice complexe, on favorisera sa purification en choisissant un volume et/ou une force éluante de lavage élevé.

Il est également à noter qu'un rendement d'extraction de 100%, obtenu avec la somme des volumes de percolation et de lavage inférieure à V_f, ne signifie pas que la quantité d'analyte dans la fraction d'élution sera maximale. En effet, la quantité maximale d'analytes retenue par l'adsorbant sera obtenue pour un volume de percolation supérieur au V_f, lorsque la concentration en analyte en sortie de colonne tendra vers la concentration percolée. Le rendement d'extraction sera alors faible. Cela pourrait s'avérer utile lorsque le Vf est faible ou lorsqu'une grande sensibilité est exigée. Cependant, cette méthode n'est pas fréquemment utilisée, probablement à cause d'une grande variabilité du rendement d'extraction, et donc d'une quantification peu précise.

2. La capacité

Le deuxième paramètre important à prendre en compte pour le développement d'une procédure SPE est la capacité du support. Elle est dépassée lorsque la quantité d'analytes à extraire est supérieure au nombre de sites actifs à la surface de l'adsorbant. Ceci conduit à une élution anticipée de l'analyte, même pour des volumes inférieurs à V_f. Une solution simple pour contourner ce problème consiste à augmenter la quantité d'adsorbant. Ce dépassement de capacité reste cependant assez rare car dans la plupart des cas, la SPE s'applique à des composés présents à l'état de trace. La capacité d'une cartouche SPE conventionnelle (support à base de silice greffée, polymères…) est généralement comprise entre 1 et 5 % de la masse d'adsorbant [82,83]. Sa détermination peut s'effectuer après avoir optimisé une procédure d'extraction en mesurant les rendements d'extraction de solutions de concentrations croissantes. Ces rendements d'extraction seront constants puis

chuterons, témoignant ainsi de la saturation du support. La capacité est donc identifiée comme étant la quantité maximale d'analyte percolée au-delà de laquelle le rendement d'extraction n'est plus constant.

D. Extraction en différé et extraction en ligne

1. Extraction en différé

a. Principe

On parle d'extraction en différé lorsque l'étape de SPE est totalement dissociée de l'analyse chromatographique. En effet, l'éluat de l'extraction est recueilli dans un flacon et peut éventuellement être évaporé à des fins de concentration ou de changement de solvant. Après reprise dans une solution appropriée, une fraction de l'éluat est injectée dans le système chromatographique. Le principal avantage de l'approche en différé est sa grande flexibilité. De nombreux paramètres peuvent être modifiés et optimisés : la quantité d'adsorbant, la nature et le volume de la solution d'élution ou le format du dispositif d'extraction. D'autre part, la simplicité de l'équipement requis en fait une méthode peu coûteuse. Des robots permettent l'automatisation de la procédure lorsque le nombre d'échantillons à manipuler est important. Cependant, les étapes manuelles d'évaporation, de reprise et d'injection peuvent constituer des sources de pertes, de pollutions et/ou d'incertitudes.

b. Formats

i. Les cartouches

La cartouche d'extraction en polypropylène avec ou sans réservoir (figure 6) est le format le plus utilisé. L'adsorbant est contenu entre deux frittés et sa granulométrie est généralement comprise entre 40 et 60 µm afin de permettre un écoulement facile des échantillons et des différentes solutions de la procédure d'extraction sans perte de charge trop importante. Les cartouches de 3 et 6 mL, contenant 500 mg de phase, sont les plus populaires. Cependant, l'amélioration de la sensibilité des systèmes analytiques permet de réduire les volumes d'échantillons nécessaires, donc les volumes d'adsorbant. Les cartouches de 1 mL, contenant moins de 100 mg d'adsorbant, sont donc de plus en plus répandues [84].



Figure 6 : Cartouches pour l'extraction sur phase solide. Adapté de [85,86]

ii. Les disques

Les disques pour l'extraction sur phase solide sont constitués d'une membrane de PTFE d'environ 0,5 mm d'épaisseur dans laquelle des particules d'adsorbant sont incorporées. Ces particules représentent 90% de la masse du disque. L'importante surface de section permet l'emploi de particules de faible granulométrie (entre 8 et 12 µm) ainsi que l'utilisation de débits plus élevés que pour les cartouches (jusqu'à 200 mL/min). Ce format est particulièrement intéressant pour l'extraction de grands volumes d'échantillon en un temps court. Comme le montre la Figure 7, ils sont utilisés de la même manière qu'un papier filtre lors d'une filtration sous vide. Cependant, pour l'extraction de plus faibles volumes, un format miniaturisé est disponible intégrés dans cartouche de polypropylène. Dans ce cas, le PTFE est souvent remplacé par de la fibre de verre [87].



Figure 7 : Disque pour l'extraction sur phase solide et son dispositif [88]

iii. Les plaques SPE à 96 ou 384 puits

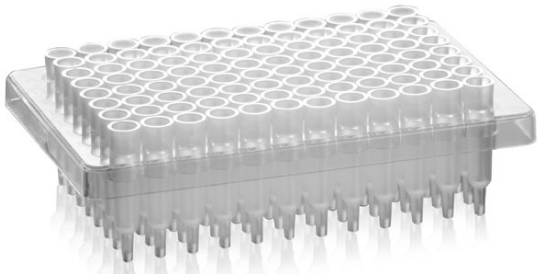


Figure 8 : Plaque SPE de 96 cartouches [89]

Le format de plaques à 96 puits est apparu pour répondre aux besoins du haut débit d'analyse d'échantillons par un processus automatisé. Sur chacun des 96 puits se trouve une cartouche SPE de 1 ou 2 mL contenant 5 à 100 mg d'adsorbant. Les plaques à 384 puits permettent aujourd'hui de traiter plus d'échantillon par unité de temps, toutefois, des problèmes de contaminations de puits à puits ainsi que d'inhomogénéité de débit peuvent survenir [84].

2. Extraction en ligne

a. Principe

L'adsorbant peut aussi être placé dans une précolonne, installée sur une vanne de commutation à six voies, sur laquelle sont également connectées une pompe permettant la percolation de l'échantillon, une pompe analytique et la colonne analytique. La différence principale avec l'extraction en différé est que les analytes piégés lors de l'extraction sont transférés directement de l'adsorbant à la colonne analytique. Ce type de montage, dit d'extraction en ligne, est présenté en figure 9.

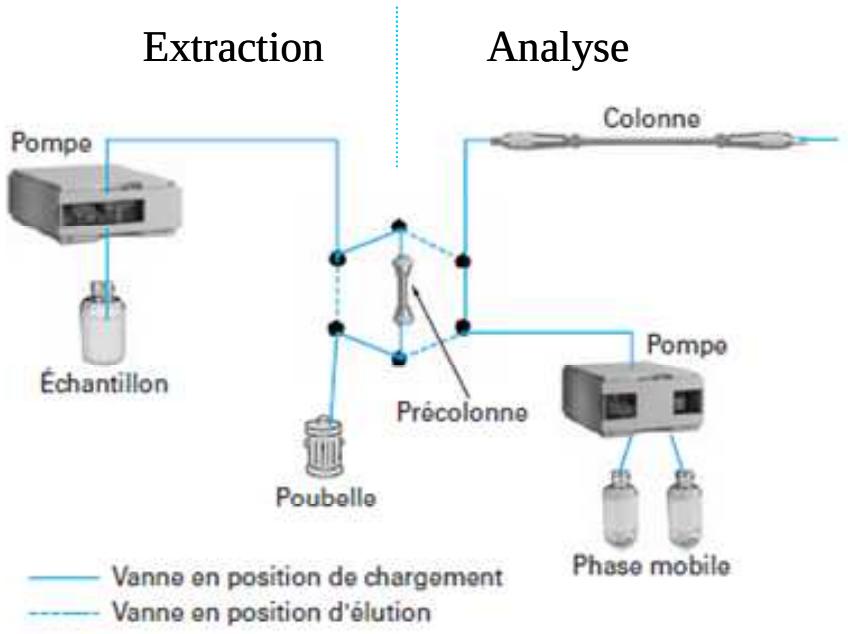


Figure 9 : Couplage en ligne de l'extraction sur phase solide avec la chromatographie en phase liquide [82].

Les solutions de conditionnement, de percolation et de lavage sont passées à travers la précolonne via la pompe de préconcentration. L'étape d'élution est réalisée en commutant la vanne, ce qui provoque le passage de la phase mobile grâce à la pompe analytique, par la précolonne pour assurer la désorption des composés et leur transfert vers la colonne analytique. Généralement, on réalise le montage de sorte à effectuer une élution en mode rétro-balayage (back flush), c'est-à-dire en procédant à l'élution en sens contraire du sens de percolation. Ceci permet de limiter les phénomènes d'élargissement de bande mais aussi de transférer simultanément des solutés vers la colonne analytique quel que soit leur facteur de rétention sur la précolonne, facilitant ainsi la comparaison des temps de rétention avec une injection directe. Cependant, dans le cas d'extractions d'échantillons environnementaux ou biologiques, ce type de montage engendre la concentration des matières en suspension en tête de précolonne et donc le transfert de ceux-ci vers la colonne analytique lors de l'élution, ce qui peut engendrer son colmatage.

Contrairement à la méthode en différé où seule une fraction de l'éluat est injectée, ici, la totalité des composés retenus par l'adsorbant est entraînée vers la colonne analytique. Ce gain en sensibilité permet de pouvoir réduire le volume percolé, surtout pour des échantillons pour lesquels de faibles volumes sont disponibles, tout en gardant une sensibilité suffisante. D'autre part, l'approche en ligne minimise le nombre d'interventions à effectuer pour préparer l'échantillon. Les risques de perte ou de contamination que l'on rencontre en mode différé sont donc largement réduits, faisant de l'approche en ligne une méthode plus juste et plus

précise. De plus, cette méthode possède l'avantage de consommer moins de solvant organique, l'élution étant assurée par la phase mobile.

Le fait que la précolonne soit placée en série avec le système chromatographique implique quelques contraintes. Tout d'abord, la précolonne et l'adsorbant doivent pouvoir résister aux pressions générées par le système chromatographique. L'échantillon et la phase mobile doivent également être miscibles, alors qu'en mode différé, un changement de solvant est possible. De plus, à chaque extraction correspond une analyse, contrairement au mode en différé où plusieurs analyses sont possibles à partir d'un même éluat. En ce qui concerne les dimensions de la précolonne, il est recommandé d'utiliser un diamètre équivalent ou inférieur à celui de la colonne analytique afin d'éviter ou de limiter les phénomènes d'élargissement de pics. La nature de l'adsorbant utilisé pour une extraction en ligne et la phase stationnaire de la colonne analytique doivent également être adroitement choisies de manière à permettre un couplage efficace. En effet, la colonne analytique doit idéalement être plus rétentive que la précolonne, de sorte à concentrer les analytes en tête de colonne analytique après leur élution de la précolonne, afin d'éviter de nouveau les élargissements ou traînes de pics. Cette condition peut être difficile à respecter dans le cas de l'extraction de composés très polaires qui nécessitent des adsorbants très hydrophobes pour leur extraction (comme on le verra par la suite), et des phases mobiles très riches en eau pour assurer leur rétention en chromatographie de partage à polarité de phases inversée, ce qui engendre un mauvais transfert de ces analytes. Toutefois, ces asymétries de pics peuvent parfois être corrigées. L'utilisation d'un gradient avec un taux en solvant organique initial et une pente relativement élevés peut entraîner une compression du pic. D'autre part, si la colonne analytique est d'un diamètre significativement plus important que celui de la précolonne, le débit plus élevé imposé par cette colonne rendra plus rapide le transfert des analytes de la précolonne vers la colonne analytique, et donc des pics plus étroits seront obtenus. Le fait que le mode en ligne n'implique que peu d'interventions rend son automatisation intéressante, la contrainte la plus importante étant de maintenir l'étanchéité du système lors des changements de précolonne. Enfin, les systèmes automatisés permettent de procéder à l'extraction d'un échantillon pendant l'analyse de l'échantillon précédent, ce qui diminue le temps total d'analyse.

b. Formats

Alors que les cartouches ou les disques utilisés pour l'extraction en différé ne sont pas restreints en taille, les dimensions des précolonnes employées pour

l'extraction en ligne sont limitées par celles de la colonne analytique (cf paragraphe précédent). Une longueur de précolonne inférieure à 15 millimètres est recommandée pour le couplage à des colonnes analytiques classiques de longueur comprise entre 15 et 25 cm [90]. Comme déjà évoqué, le diamètre interne de la précolonne doit être inférieur ou égal à celui de la colonne analytique.

Les dimensions des précolonnes utilisées par les automates sont comprises, selon les modèles, entre 5 et 10 mm de longueur pour 2 à 4 mm de diamètre interne [91]. Ces précolonnes sont généralement destinées à un usage unique, même si certaines d'entre elles peuvent être réutilisées.

E. Les différents adsorbants utilisés

Le choix de l'adsorbant à utiliser pour l'étape de SPE dépend en premier lieu de la nature de l'échantillon (aqueux ou organique), et ensuite de la nature du ou des analytes à extraire (polarité, propriétés acido-basiques, taille, groupes fonctionnels). En effet, une réflexion préalable doit être menée sur la nature des interactions impliquées dans le mécanisme de rétention des analytes d'intérêt sur l'adsorbant afin de choisir l'adsorbant adéquat. Ainsi, les adsorbants peuvent être classés en fonction de la nature des interactions qu'ils développent avec les analytes.

1. Les adsorbants polaires

Les principaux adsorbants polaires sont la silice vierge, la silice greffée par des groupements polaires (diols, amines ou nitriles), l'alumine ou le Florisil. Grâce à ce type d'adsorbants, les analytes sont extraits d'échantillons apolaires par le développement d'interactions polaires. L'élution est réalisée par percolation d'un solvant polaire pour rompre ces interactions. Les principales applications de ce type d'adsorbant concernent les échantillons non aqueux, comme les huiles ou les produits pétroliers. Ils peuvent également intervenir comme support de purification après une première étape d'extraction par solvant d'un échantillon solide. A titre d'exemple, l'analyse de l'OTA dans des denrées alimentaires peut être réalisée par une première étape d'extraction par solvant suivie d'une purification par SPE avec de la silice vierge [67]. De la même manière, ces adsorbants peuvent être utilisés pour purifier les extraits apolaires lors de la recherche de cocaïne dans des tissus biologiques ou dans des organes [92].

2. Les adsorbants apolaires

Les adsorbants à polarité de phases inversée sont les plus couramment utilisés pour les échantillons aqueux. Les analytes y sont retenus par interactions hydrophobes et élués par percolation d'un solvant organique. La silice greffée n-alkyle (C8 ou C18) et les polymères hydrophobes (polystyrène-divinylbenzène principalement) sont les adsorbants les plus utilisés. Ces deux types de supports présentent l'avantage de résister à la pression et d'être utilisés avec des solvants compatibles avec les phases mobiles de la chromatographie liquide de partage à phases inversée, ce qui permet leur utilisation dans un système en ligne. La silice C18 souffre cependant de quelques limitations. En effet, elle ne peut être utilisée qu'entre pH 2 et pH 8 alors que les polymères sont stables sur toute la gamme de pH (0-14). De plus, les polymères hydrophobes possèdent un plus grand pouvoir rétentif pour les composés polaires. Néanmoins, la silice C18 reste de loin l'adsorbant le plus utilisé [93]. Elle permet par exemple l'extraction de la cocaïne du plasma ou de l'urine [26,94], ou encore l'extraction de l'OTA du vin ou de la bière [53,75,95].

3. Les échangeurs d'ions

Les échangeurs d'ions sont constitués de silice ou de polymères greffés par des groupements ionisés ou ionisables, comme les acides carboxyliques ou les acides sulfoniques pour les échangeurs de cations, ou les amines pour les échangeurs d'anions. Des mécanismes de rétention basés sur des interactions électrostatiques sont mis en jeu sur ce type de support. Les composés à extraire ainsi que les sites actifs du support doivent être ionisés au pH de la solution percolée pour qu'ils puissent interagir. L'élution peut être réalisée en percolant une solution dont le pH neutralise soit les analytes, soit les sites actifs du support. Si la gamme de pH utilisable ne permet pas cette neutralisation, une solution à forte force ionique peut permettre l'élution des analytes. L'inconvénient majeur de ce type d'adsorbant est qu'ils sont peu performants pour l'analyse de traces de composés organiques ionisables dans des échantillons à forte teneur en ions inorganiques, comme les échantillons environnementaux ou biologiques. En effet, les sites de rétention sont saturés par ces ions et deviennent incapables de retenir les analytes d'intérêt.

4. Les supports mixtes

Les adsorbants décrits précédemment retiennent les analytes par le développement d'un seul type d'interaction. Tous les composés présents dans

l'échantillon pouvant également être retenus par ce type d'interaction seront co-extraits. De plus, si la séparation chromatographique est basée sur un mécanisme de rétention proche de celui de l'étape de SPE, les composés co-extraits peuvent causer des co-élutions lors de la séparation. Les supports mixtes, basés sur la contribution de deux mécanismes de rétention différents, permettent d'obtenir une meilleure purification par cette étape d'extraction.

Les supports mixtes les plus courants associent une rétention hydrophobe, assurée par une silice greffée C18 ou C8 ou par un polymère hydrophobe, à une rétention par échange d'ions, assurée par des groupements acides ou basiques introduits par greffage ou polymérisation de co-monomères fonctionnalisés. Lors de la percolation de l'échantillon aqueux, les analytes sont retenus par interactions hydrophobes et par interactions électrostatiques si l'état d'ionisation de la molécule au pH de l'échantillon le permet. L'avantage de ces supports est que plusieurs lavages, chacun favorisant une interaction tout en rompant l'autre, peuvent être effectués. Ainsi, un lavage par une solution polaire permettra l'élimination de tous les sels et les composés faiblement retenus par interactions hydrophobes tout en conservant les analytes. Après avoir mis les analytes sous forme ionisée, un lavage avec une solution apolaire permettra l'élimination de tous les composés apolaires ne pouvant développer, comme les analytes, des liaisons électrostatiques avec l'adsorbant. Ceci réduit le nombre potentiel de composés interférents co-extraits, puisque seuls seront co-extraits ceux qui possèdent une polarité voisine et la même charge (positive ou négative) que l'analyte d'intérêt. Ce type d'adsorbant est d'ailleurs très largement utilisé pour l'extraction de la cocaïne et de ses métabolites de fluides biologiques [6,7,16,17,19,21,22,25,28,29,35,41,42,96,97].

5. Limitations des supports conventionnels

Pour l'extraction de composés à l'état de traces dans les matrices complexes, les supports présentés précédemment ne permettent pas toujours une purification suffisante de l'échantillon. Le risque d'extraction de composés interférents est élevé, ce qui peut engendrer des pics chromatographiques impurs, faussant ainsi la quantification des analytes d'intérêt. Une purification efficace est également nécessaire pour les analyses en chromatographie liquide couplée à des détecteurs spécifiques, tels que la spectrométrie de masse. En effet, bien que ce détecteur soit spécifique et très sensible, il est parfois sujet à des effets de matrices, causés par des composés interférents co-élués, et se manifestant par une diminution ou une amplification du signal [98]. Ils affectent alors la justesse et la précision de la méthode analytique, conduisant à des résultats moins fiables [99,100]. La présence

et l'importance de ces effets de matrice sont mesurées en comparant les réponses obtenues lors de l'injection d'un standard et celle d'un échantillon dopé après traitement. Leur évaluation lors du développement d'une méthode analytique est indispensable au risque d'augmenter la probabilité d'obtenir des faux négatifs ou faux positifs [101]. Un exemple de la manifestation de ce phénomène est présenté en figure 10. Les auteurs ont dopé différents légumes par un pesticide, le triflumizol, à la même concentration et les réponses observées ont été comparées à celle obtenue en milieu pur.

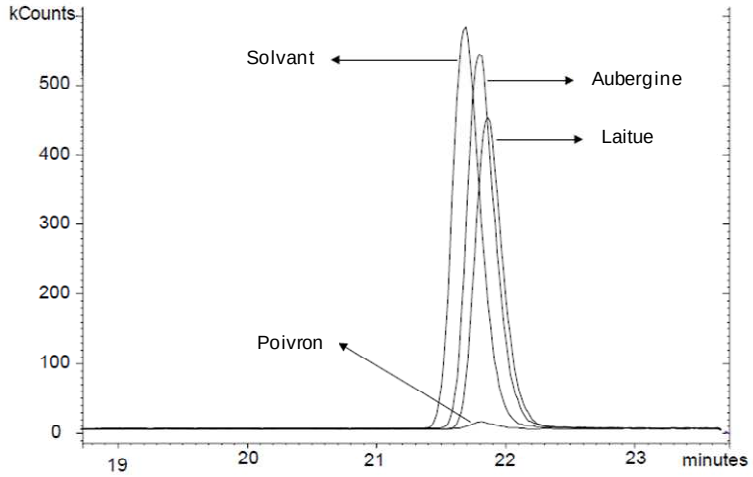


Figure 10 : Exemple d'effet de matrice en LC-MS². Analyse du triflumizol dans différents légumes dopés à la même quantité. Adapté de [102]

Une grande différence de signal a été observée indiquant la présence d'effets de matrice, en particulier pour le poivron, pour lequel une suppression quasi-totale du signal est observée. Plusieurs solutions existent pour réduire ou éliminer des effets de matrices. Le recours à des standards isotopiques peut être efficace, à condition qu'ils se comportent de la même manière que l'analyte face aux effets de matrice [98]. Toutefois, le nombre d'isotopes disponibles est limité et ils restent relativement chers. Une autre approche consiste à éliminer les co-élutions responsables des effets de matrice en améliorant la séparation chromatographique, menant en contrepartie à un allongement du temps d'analyse. Ces co-élutions peuvent également être éliminées lors d'une étape de traitement de l'échantillon permettant sa purification, telle que l'extraction sélective sur phase solide.

L'extraction sélective sur phase solide a pour objectif d'extraire uniquement le ou les analytes d'intérêt de l'échantillon complexe. Des supports plus sélectifs basés sur des mécanismes de reconnaissance moléculaire ont donc été développés. Il existe à l'heure actuelle deux types de supports dont la rétention est basée sur la reconnaissance moléculaire : les immunoadsorbants et les polymères à empreintes moléculaires.

6. Les supports biologiques à reconnaissance moléculaire : les immunoadsorbants

Ce type de support exploite l'affinité et la spécificité des anticorps envers leur antigène.

a. Les anticorps et leur utilisation en bioessais

Les acides aminés, constituants des anticorps, possèdent des groupements hydrophobes, hydrophiles, basiques, acides ou aromatiques. Ainsi, des interactions de type électrostatique, liaison hydrogène, forces de Van der Waals et effets hydrophobes peuvent se mettre en place avec les groupements de l'antigène grâce à la complémentarité stérique du site de reconnaissance de l'anticorps. Bien que la liaison antigène/anticorps soit non covalente, elle est constituée d'une somme d'interactions de plusieurs types qui permettent d'atteindre une forte énergie de liaison. Il en résulte des constantes d'affinité élevées, d'environ 10^8 à 10^{12} $mol.L^{-1}$.

Les anticorps sont capables de fixer, plus ou moins fortement, des analytes de structure proche de celui utilisé pour l'immunisation. Ce phénomène est appelé réactivité croisée. Cependant, cette réactivité croisée ne peut pas être prédéfinie, du fait de la synthèse *in vivo* des anticorps, et doit être évaluée pour chaque nouvel anticorps obtenu.

Les propriétés des anticorps sont exploitées dans la conception de nombreux bioessais. Ces outils analytiques présentent l'avantage d'être utilisables sur site et sont généralement dotés d'une grande sensibilité. Ils sont très souvent utilisés de manière complémentaire aux analyses chromatographiques. A titre d'exemple, la procédure pour l'analyse toxicologique de produits stupéfiants, dont la cocaïne, est composée de deux étapes : criblage par un immunoessai et confirmation par une méthode chromatographique. L'étape de criblage permet un contrôle préliminaire d'un grand nombre d'échantillons en relativement peu de temps. Étant données les lourdes conséquences que peuvent générer un faux positif, les échantillons déclarés positifs lors de cette première étape sont analysés par une méthode chromatographique plus spécifique. Concernant l'analyse de la cocaïne, les anticorps utilisés pour ces immunoessais sont essentiellement dirigés contre la benzoylecgonine, principal métabolite urinaire de la cocaïne, et possèdent des réactivités croisées très variables pour la cocaïne et les autres métabolites [15,103]. Selon la matrice biologique à analyser, l'anticorps doit être choisi en fonction de sa réactivité croisée envers le composé présent majoritairement dans cette matrice [103].

Différents de types de bioessais peuvent être utilisés pour l'analyse de la cocaïne. Bien que souvent utilisées pour leur sensibilité et leur fiabilité, les méthodes de radioimmunoessai (RIA) nécessitent de nombreuses précautions liées à l'emploi de produits radioactifs. Les techniques EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique) et surtout ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sont couramment employées sur différentes matrices comme l'urine, le sang, le sérum, la salive, la sueur et les cheveux [24].

L'analyse de l'ochratoxine A dans le vin ou dans les céréales peut être réalisée par tests ELISA [52,104] basés sur l'utilisation d'anticorps anti-ochratoxine A. Un immunocapteur électrochimique a également été récemment décris pour l'analyse de l'OTA en milieu pur [105,106], mais aussi dans le vin [107] avec une très bonne limite de détection estimée à 0,7 ppb. Un immunocapteur optique a été développé, pour l'analyse de céréales, avec une fenêtre de détection comprise entre 0,5 et 10 ppb [108]. Plusieurs autres biocapteurs ont été décris pour l'identification et la quantification de l'OTA ou de mycotoxines [109-111]. Ces méthodes bio-analytiques présentent l'avantage d'être simples à utiliser, moins couteuses et plus mobiles que les méthodes chromatographiques conventionnelles.

Des phénomènes d'effets de matrices, perturbant la réponse du bioessai et conduisant à des résultats erronés, ont cependant été observés [52]. De plus, une grande spécificité étant requise, la réactivité croisée des anticorps peut être à l'origine de faux positifs. Bien qu'étant un inconvénient pour la conception de bioessais, la réactivité croisée peut être un avantage pour l'extraction sur phase solide. En effet, elle permet l'extraction sélective et simultanée d'une famille de composés, comme par exemple un analyte et ses métabolites, qui pourront ensuite être séparés par chromatographie.

b. Les immunoadsorbants

La première méthode d'extraction sélective développée et basée sur la reconnaissance moléculaire est l'immunoextraction. Les supports d'immunoextraction sont appelés immunoadsorbants, et sont constitués d'anticorps spécifiques de la molécule cible, immobilisés sur un support solide. Lors de la percolation de l'échantillon sur ce type de support, seuls les composés cibles seront retenus de manière spécifique par les anticorps. Après l'étape de lavage, l'élution rompt la liaison antigène/anticorps permettant de récupérer un extrait contenant uniquement les molécules d'intérêt.

L'échantillon percolé doit être aqueux pour se placer dans des conditions proches du milieu physiologique dans lesquelles les anticorps ont été produits.

Concernant l'étape de lavage, une solution purement aqueuse ou avec un faible pourcentage de solvant organique peut être utilisée en fonction de la stabilité de l'anticorps employé [112]. L'élution peut être réalisée en modifiant la conformation de l'anticorps. La géométrie du site de reconnaissance n'est alors plus complémentaire à celle de l'antigène. Pour l'élution des macromolécules, souvent peu stables en présence de solvants organiques, une solution de pH acide et de force ionique élevée suffit. Concernant les petites molécules, les solvants organiques sont fréquemment choisis lorsque l'immunoadsorbant utilisé est à usage unique. En cas de réutilisation, notamment en phase de développement, une solution hydro-organique, comportant jusqu'à 80 % de solvant organique, permettra l'élution des analytes sans induire la dénaturation irréversible des anticorps. Une étape de régénération des anticorps dans une solution de tampon salin durant 48h à 4°C est toutefois nécessaire avant réutilisation [113].

Concernant l'immobilisation des anticorps, l'approche la plus commune consiste en une immobilisation covalente par la réaction de groupements amines de l'anticorps sur les sites actifs d'un support. Ce type d'immobilisation est dit aléatoire puisque chacun des groupements amines présents à la surface de l'anticorps peut être impliqué, conduisant à plusieurs orientations possibles. On estime qu'environ un anticorps immobilisé sur deux est correctement orienté pour fixer sa molécule cible [112]. D'autre part, la quantité d'anticorps introduite lors du greffage influe sur la capacité. En effet, celle-ci augmente dans un premier temps avec la quantité d'anticorps introduite puis diminue après avoir atteint une valeur maximale, probablement à cause de la gêne stérique engendrée. L'immobilisation aléatoire des anticorps ainsi que leur taille relativement importante sont les deux principaux facteurs limitant la valeur de capacité des immunoadsorbants. Généralement, des valeurs de capacité comprises entre 5 et 100 nmoles par gramme de support sont obtenues, ce qui reste toutefois suffisant pour l'extraction de composés à l'état de traces.

L'analyse chromatographique de l'OTA est très souvent précédée d'une étape de purification sur immunoadsorbants [12,50-52,54-57,61,62,66,69,70,76,77,114]. Plusieurs d'entre eux sont commercialisés (Ochraprep™ de R-Biopharm Rhône, OchraTest™ de Vicam) et leur utilisation a été validée par plusieurs organismes tels que l'AOAC (*Association of Analytical Communities*) et l'Union Européenne. De nombreuses méthodes démontrant leur apport en fiabilité et en sensibilité ont été normalisées par le Comité Européen de Normalisation (NF EN ISO 15141, EN 14132, EN 14133). Ce type de support reste néanmoins relativement onéreux puisque le prix d'une cartouche est compris entre

10 et 15 euros. Concernant l'analyse de la cocaïne, aucune étude décrivant le développement d'immunoadsorbants n'est à mentionner.

7. Supports biomimétiques à reconnaissance moléculaire : les polymères à empreintes moléculaires

Les polymères à empreintes moléculaires (MIP) sont des polymères hautement réticulés possédant des cavités spécifiques pouvant conduire à un mécanisme de reconnaissance moléculaire similaire à celui des systèmes biologiques (anticorps, enzymes, récepteurs…) [115,116]. Lors de leur synthèse, la molécule empreinte est mise en présence, dans un solvant de synthèse, d'un monomère choisi pour son affinité avec la molécule empreinte et d'un agent réticulant. Après une étape de pré-complexation par liaisons non covalentes établies entre les groupes fonctionnels de la molécule empreinte et les monomères, un initiateur de polymérisation est ajouté au mélange et, par initiation thermique ou photochimique, les monomères et les agents réticulants polymérisent autour de la molécule empreinte, formant ainsi les cavités. Une fois la polymérisation terminée, le polymère est lavé pour éliminer la molécule empreinte et pour rendre les cavités disponibles. Le principe de la synthèse est schématisé en figure 11.

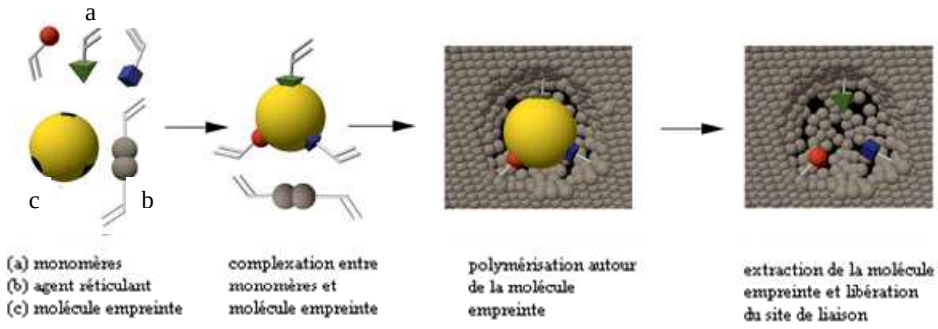


Figure 11 : Principe de la synthèse de polymères à empreintes moléculaires. Adapté de [117]

Afin d'évaluer la rétention spécifique du MIP synthétisé, on effectue en parallèle la synthèse d'un polymère non imprimé (NIP, Non Imprinted Polymer) en utilisant le même protocole de synthèse mais sans ajouter la molécule empreinte. Ce polymère sans cavités jouera le rôle de témoin pour différencier les interactions non spécifiques, présentes à la fois sur le MIP et sur le NIP, des interactions spécifiques, présentes uniquement sur le MIP, car liées à la présence des cavités.

Les étapes de conditionnement du support et de percolation de l'échantillon sont souvent effectuées dans un solvant proche du milieu de synthèse ce qui permet de développer des interactions similaires à celles obtenues lors de la formation du

complexe monomère/molécule empreinte avant polymérisation. Le lavage est effectué avec un solvant de nature très proche du solvant de percolation, dans le but d'éliminer d'éventuels interférents faiblement retenus par interactions non spécifiques avec la phase de polymère, sans éliminer les analytes cibles retenus au sein des cavités. L'élution est ensuite réalisée avec un solvant permettant la rupture les liaisons établies entre le composé cible et le MIP. Lorsqu'il s'agit d'interactions hydrophiles, on utilise un solvant polaire protique. Le solvant d'élution peut également être acidifié si des interactions électrostatiques sont mises en jeu.

A la différence des immunoadsorbants, la stabilité des MIP leur permet de pouvoir être réutilisés aussitôt après le passage d'un solvant adapté afin de reconditionner le support. La synthèse des MIP est rapide et peu onéreuse si la molécule modèle est disponible à faible coût. Les valeurs de capacité obtenues sur ces supports sont généralement comprises entre 1 et 40 µmoles par gramme de support [116]. Ces valeurs sont plus de cent fois supérieures à celle observées sur les immunoadsorbants. Une étude, comparant les capacités d'un immunoadsorbant et d'un MIP destinés à la même molécule, a mis en avant une capacité trente fois supérieure pour le MIP [118]. Ceci souligne donc le potentiel des MIP, en particulier pour leur emploi dans des dispositifs miniaturisés.

Leur principal inconvénient est le phénomène de relargage. En effet, lors de l'utilisation du support, on peut observer une libération tardive de la molécule empreinte, ce qui peut fausser les résultats par surestimation de la quantité de molécule cible détectée. Ce phénomène provient du fait que l'élimination de la molécule empreinte après polymérisation peut être difficile. Pour contourner ce problème, il est possible de synthétiser le MIP en utilisant un analogue structural de la molécule d'intérêt. Ainsi, le MIP obtenu reste capable d'extraire la molécule d'intérêt sans que le relargage de la molécule empreinte ne gêne sa quantification. Cette stratégie a été employée pour la synthèse de plusieurs MIP pour l'extraction de l'ochratoxine A [119-122]. Des MIP anti-cocaïne ont également été développés en utilisant la cocaïne comme molécule empreinte [123-125] ou un analogue structural [126]. Cependant, ces analogues structuraux peuvent être onéreux voire indisponible pour certaines molécules. D'autre part, la synthèse de polymères à empreintes moléculaires peut être difficile pour certains analytes, comme pour les molécules très polaires insolubles dans les solvants généralement utilisés.

Bien que la synthèse des polymères à empreintes moléculaires soit relativement rapide, l'optimisation de la procédure d'extraction est souvent plus complexe que pour les immunoadsorbants, en particulier pour le traitement d'échantillons aqueux. En effet, contrairement aux immunoadsorbants, les

interactions développées lors de la percolation d'échantillons aqueux sont principalement hydrophobes, donc de nature non spécifique. Une ou plusieurs étapes de lavages sont ensuite nécessaires pour ne développer uniquement les interactions spécifiques et éliminer les composés non ciblés. A titre d'exemple, la procédure de lavage développée sur un polymère à empreintes moléculaires spécifique à l'OTA est composée de quatre lavages indispensables à l'élimination des interférents retenus par interactions non spécifiques [122]. Ces différents lavages sont constitués de 1 mL de HCl 0,1 M, 1 mL d'un mélange HCl 0,1 M / acétonitrile (60/40), 10 mL d'eau ultrapure afin d'éliminer les interférents polaires et moyennement polaires, puis 4 mL d'acétonitrile avec 0,01% d'acide acétique afin d'éluer les composés apolaires tout en permettant la rétention de l'OTA par le développement d'interactions polaires spécifiques au sein des cavités.

F. Conclusion

Après cette revue des différents supports d'extraction disponibles, il apparaît clairement qu'il n'existe pas de support universel. Le choix de ce support est dicté par la nature de l'échantillon, mais également par le nombre de composés à extraire. Lorsque l'objectif de l'étape d'extraction est de concentrer l'échantillon pour y rechercher la présence de nombreux composés, les supports peu spécifiques, comme les silices greffées ou les polymères hydrophobes, restent ceux présentant le plus fort potentiel. L'inconvénient de ces supports est qu'ils conduisent également à l'extraction de nombreux composés interférents ; un grand soin doit alors être apporté à la séparation chromatographique afin de limiter d'éventuelles coélutions, qui sont source d'erreurs et d'effets de matrice. Un temps d'analyse long et des détecteurs spécifiques sont alors très souvent nécessaires.

Concernant l'extraction d'un nombre réduit de composés, les supports plus spécifiques paraissent mieux adaptés. Ceci est d'autant plus vrai lorsque le ou les analytes à extraire sont présents à l'état de traces dans des matrices complexes. En effet, de hauts degrés de purification limitent la co-extraction de composés interférents, ils autorisent ainsi une étape de séparation moins poussée, donc plus rapide, et l'utilisation de détecteurs moins spécifiques, donc moins onéreux. Ces supports plus sélectifs permettent également de limiter les risques d'effets de matrice pour les détecteurs spécifiques tels que la spectrométrie de masse. Les supports dont la rétention est basée sur des mécanismes de reconnaissance moléculaire, les immunoadsorbants ou les polymères à empreintes moléculaires, sont ceux qui permettent d'atteindre la meilleure purification.

La figure 12 présente un exemple d'application de ces deux types de supports. Le chromatogramme correspondant à l'injection d'un extrait de sol dopé par des pesticides (A) est comparé à ceux obtenus lors de l'injection de ce même extrait traité par un polymère à empreintes moléculaires (B) ou un immunoadsorbant (C).

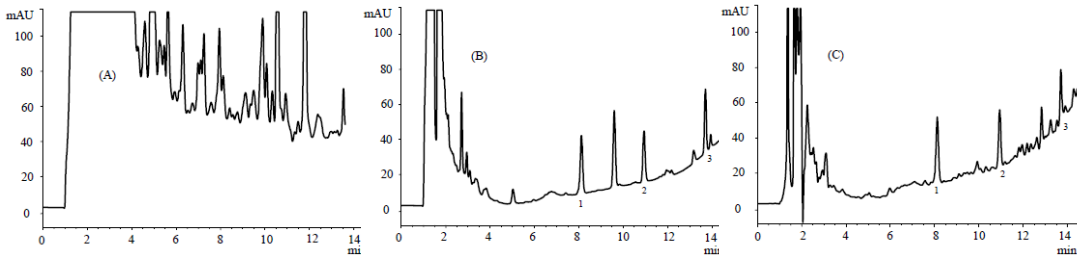


Figure 12 : Chromatogrammes obtenus après l'injection d'un extrait de sol dopé par des pesticides sans traitement (A) et avec traitement par un polymère à empreintes moléculaires (B) et un immunoadsorbant (C). (1) atrazine; (2) simazine; (3) terbutylazine. Adapté de [118]

Comme le montre cette figure, ces supports hautement sélectifs permettent l'élimination de très nombreux composés interférents qui empêchent la détection des analytes ciblés lors de l'injection de l'échantillon non traité. Les chromatogrammes sont ainsi considérablement simplifiés ce qui facilite la quantification des analytes recherchés.

Cependant, une nouvelle classe de molécules, nommées « aptamères », est de plus en plus employée comme outil de reconnaissance moléculaire dans des applications diverses. Ces oligonucléotides possèdent des propriétés d'affinité et de spécificité qui leur confèrent un grand potentiel pour des applications analytiques. Leur utilisation en tant que support pour extraction sélective sur phase solide a fait l'objet de cette thèse. Ces molécules aux propriétés prometteuses seront très largement décrites dans le chapitre suivant.

Chapitre 2 – Les aptamères

Chapitre 2 – Les aptamères

Les aptamères sont des oligonucléotides artificiels de longueur généralement comprise entre 20 et 60 nucléotides. Le mot aptamère est issu de l'association du mot latin « aptus » (adapté à, attaché à…) et du suffixe « mère » faisant référence à l'unité de base d'un polymère. Ces acides nucléiques, isolés parmi une banque très complexe d'acides nucléiques par un procédé de sélection itératif, ont la propriété de pouvoir se lier à leur molécule cible avec une très grande affinité, comparable à celle des anticorps pour leur antigène. Le paramètre qui rend compte de l'affinité est la constante de dissociation K_d. Les aptamères possèdent également une grande spécificité, c'est-à-dire que les mécanismes de reconnaissance moléculaire mis en jeu lors de la fixation à la cible permettent l'établissement d'interactions discriminantes capables, par exemple, de distinguer une molécule de son énantiomère. Des aptamères peuvent également être sélectionnés pour des propriétés catalytiques comme le clivage de liaison amide ou la formation de liaison carbone-carbone. On parle alors d'« aptazymes ». Ce type d'aptamères ne sera pas abordé mais une revue détaillée a été récemment proposée par Schlosser et al [127].

I. Structure des aptamères

Comme pour les protéines, la description de la structure des acides nucléiques est hiérarchisée en structure primaire, secondaire et tertiaire.

A. La structure primaire

La structure primaire des acides nucléiques correspond à la séquence de nucléotides qui les compose. Chaque nucléotide est constitué de trois parties : une base azotée, un sucre et un groupement phosphate. L'ADN et l'ARN se différencient par la nature du sucre qui les compose : le 2-désoxyribose pour l'ADN et le ribose pour l'ARN. Concernant les bases azotées, l'adénine (A), la cytosine (C) et la guanine (G) sont présentes à la fois dans l'ADN et l'ARN, alors que la thymine (T)

est spécifique de l'ADN et l'uracile (U) de l'ARN. La structure des acides nucléiques et de leurs bases associées sont présentées en Figure 13.

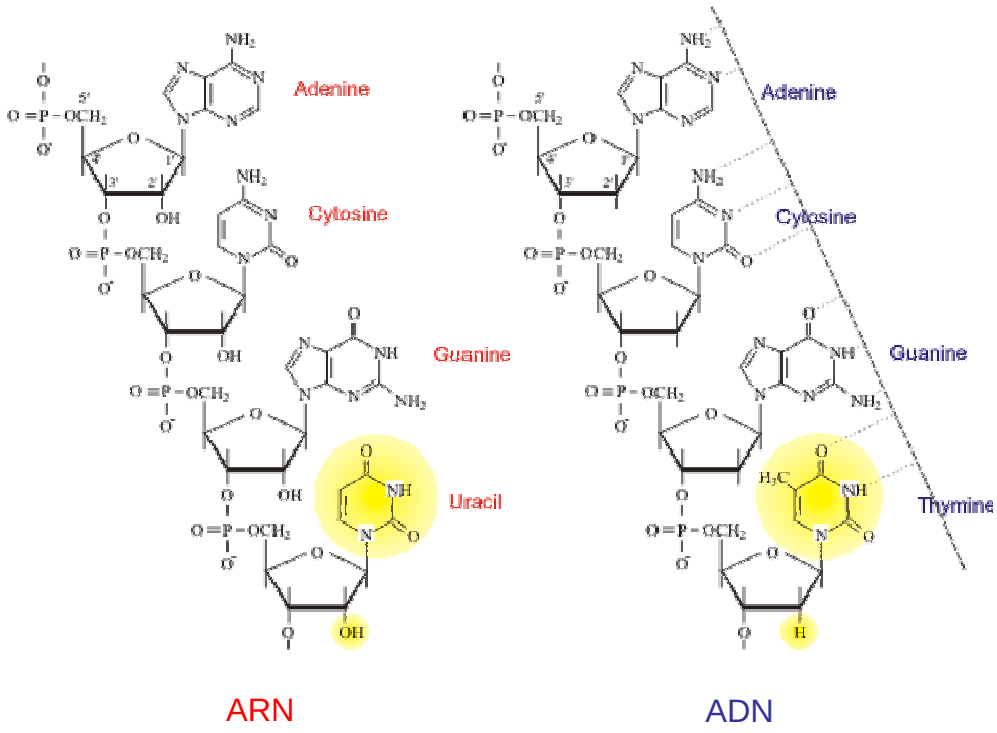


Figure 13 : Structure des acides nucléiques et de leurs bases. Adapté de [128]

Par convention, la séquence d'un acide nucléique est donnée dans le sens 5' vers 3', en référence aux numéros des atomes de carbone du sucre qui les compose. Chaque nucléotide porte une charge négative sur son groupement phosphate, les acides nucléiques sont donc des polymères anioniques d'état de charge théorique égal à leur nombre de nucléotides.

B. La structure secondaire

La structure secondaire correspond à la description de la structure tridimensionnelle localement adoptée par certains segments de l'acide nucléique.

1. Les paires de bases

La flexibilité du squelette (désoxy)ribose-phosphate permet à deux régions complémentaires d'un même brin d'ADN ou d'ARN de s'associer en appariant leurs bases azotées. Les paires de bases dites canoniques, ou encore, paires Watson-Crick

se forment entre l'adénine et la thymine (ADN) ou l'uracile (ARN) par deux liaisons hydrogène, et entre la guanine et la cytosine par trois liaisons hydrogène (Figure 14).

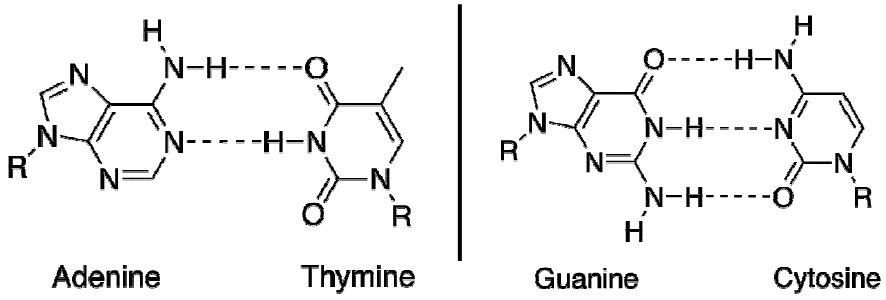


Figure 14 : Les paires de bases canoniques et leur appariement par liaisons hydrogène. Adapté de [129]

La force de la liaison entre deux régions associées dépend du nombre de paires de bases appariées consécutives, de la présence d'éventuels mésappariements et également de la proportion de paires G/C, cette paire étant plus stable que la paire A/T(U). La complémentarité des bases est la condition *sine qua non* pour l'appariement de deux régions, mais les liaisons hydrogène formées ne participent que peu à la stabilisation de la structure. En effet, cette stabilisation est principalement due aux interactions d'empilement des hétérocycles des bases azotées [130].

2. Les motifs structuraux

Lorsqu'un acide nucléique simple brin se replie sur lui-même en une structure plus stable, des motifs structuraux composés d'une combinaison d'hélices (pour les paires de bases contigües), et de boucles (pour les nucléotides non appariés) sont adoptés [131,132]. Les principaux motifs structuraux sont représentés en figure 15.

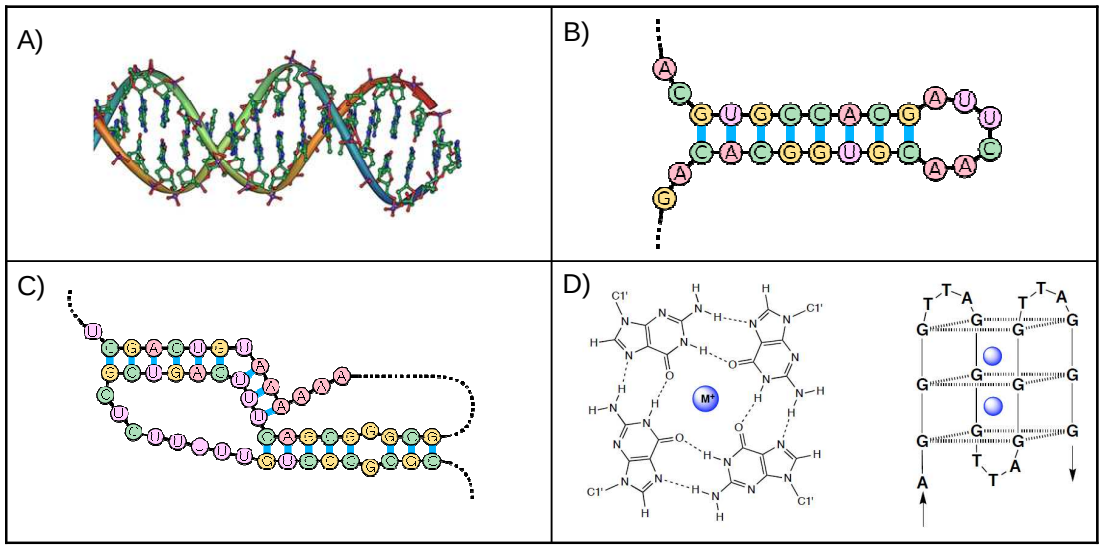


Figure 15 : Représentation schématique des principaux motifs structuraux. (A) : la double hélice [133] ; (B) : la tige boucle [134] ; (C) : le pseudo-nœud [135] ; (D) : Structure (gauche) et empilement (droite) des tétrades de G [136]

Lorsqu'un segment composé de plusieurs paires de bases consécutives est formé, une structure en double hélice s'établie (Figure 15 A). Des saillies, régions dans lesquelles un brin possède une base superflue sans base complémentaire sur l'autre brin, sont fréquemment observées et fragilisent la structure.

Le repliement d'un brin sur lui-même pour former une double hélice forme une structure en « épingle à cheveu », ou « tige-boucle » (Figure 15 B). La stabilité de cette structure dépend de la stabilité de l'hélice formée et de la longueur de la boucle, généralement comprise entre 4 et 8 nucléotides. Certaines boucles, appelées « tétraboucles » (*tetraloops*), sont particulièrement stables du fait de l'appariement des premières et dernières bases, d'un fort empilement et d'un réseau de liaisons hydrogène.

Les nucléotides de la boucle d'une tige-boucle peuvent s'apparier avec une autre région du brin à l'extérieur de la tige pour former un motif appelé « pseudo-nœuds ». Cette structure possède donc deux hélices (Figure 15 C).

Quatre guanines peuvent s'associer dans un même plan, chacune étant un donneur et un accepteur de deux liaisons hydrogène, pour former des tétrades de G, ou « *G quartets* ». L'empilement d'au moins deux tétrades, intercalées par un cation monovalent, le potassium généralement, entraîne une structure très stable constituée de quatre brins (Figure 15 D). Il y aura autant de tétrades de G que de guanines adjacentes répétées selon un multiple de quatre dans la séquence.

C. La structure tertiaire

La structure tertiaire décrit la structure tridimensionnelle générale de la molécule. Les motifs de structure secondaire décris précédemment interagissent pour former une structure globale compacte. Les riboses peuvent, par exemple, stabiliser le rapprochement électrostatique défavorable des hélices en développant des liaisons hydrogène. Deux boucles peuvent « s'embrasser » par appariement de résidus complémentaires pour former une structure appelée « *kissing complex* ». Les cations, monovalents et divalents, ainsi que les molécules d'eau jouent un rôle très important dans le maintien de la structure de la molécule par l'établissement d'interactions polaires.

D. Fixation d'un aptamère à sa cible

Les paragraphes précédents démontrent que les repliements de la chaîne des oligonucléotides dans l'espace, donc sa structure tridimensionnelle, sont dictés par leur séquence. Ces repliements entraînent la formation d'une structure compacte possédant éventuellement des sites d'interaction ou de reconnaissance. Ces sites de reconnaissance peuvent développer avec leur cible les mêmes types d'interaction que celles développées au sein de l'oligonucléotide pour maintenir sa structure secondaire et tertiaire [137].

Contrairement aux anticorps, aux enzymes ou aux récepteurs protéiques, les aptamères font preuve d'une grande flexibilité structurelle. La fixation de l'aptamère à sa cible entraîne un ajustement de la structure de l'aptamère qui renforce la liaison. Lorsque la cible est une petite molécule, il est très fréquent que l'aptamère enveloppe totalement ou en grande partie sa cible, permettant ainsi une reconnaissance spécifique. Le repliement de l'aptamère autour de sa cible permet la mise en place d'un maximum d'interactions intermoléculaires discriminantes. La résolution des structures de certains complexes aptamère/cible a permis la compréhension des mécanismes mis en jeu dans cette liaison. La figure 16 présente, à titre d'exemple, les structures résolues des complexes avec les antibiotiques néomycine B et tobramycine.

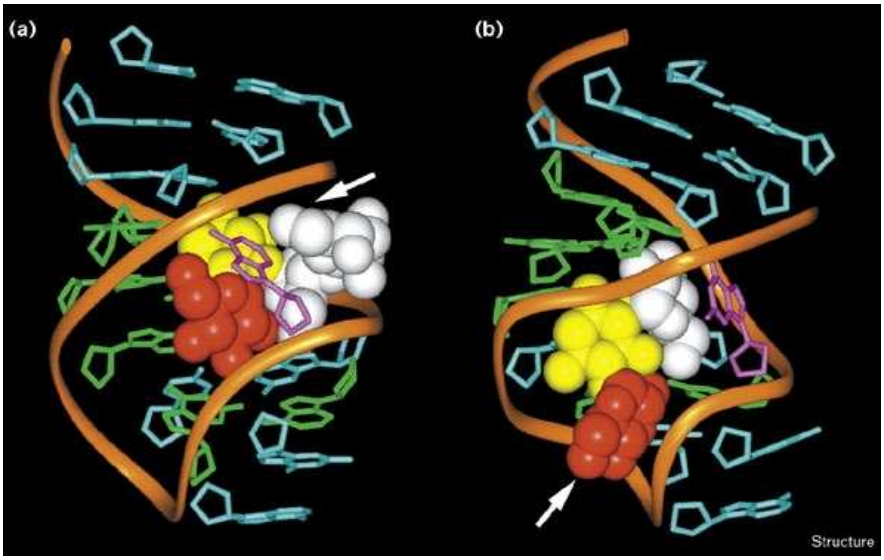


Figure 16 : Représentation de la structure tertiaire des complexes (a) aptamère-néomycine B (b) aptamère-tobramycine. La structure de l'aptamère est représentée en rubans et bâtons et les molécules sont représentées en boules pleines [138]

Selon les cibles, cette discrimination peut être stérique, comme pour l'aptamère théophylline incapable de se lier à la caféine alors qu'elle ne possède qu'un seul groupement méthyle supplémentaire [139]. Elle peut aussi être liée à un arrangement spécifique de liaisons hydrogène, requit pour former des pseudos paires de bases avec la cible. C'est le cas de l'aptamère adénosine mono-phosphate (AMP), qui fixe le groupement adénine de sa cible en reconstruisant une paire de base avec une guanine. L'aptamère citrulline, ne reconnait pas non plus l'arginine qui ne diffère pourtant que d'un groupement imine (remplaçant le groupement amide de la citrulline), mais qui change la taille et l'orientation des groupements polaires [140]. Pour des composés aromatiques à structure plane, enclins à s'intercaler de manière non spécifique dans une structure en double hélice, des aptamères alliant affinité et spécificité, grâce à une combinaison d'interactions d'empilement et de liaisons hydrogène, ont été identifiés. Les aptamères théophylline [141], flavine mononucléotide (FMN) [142] et adénosine monophosphate [143] en sont des illustrations. L'aptamère contre les antibiotiques aminoglycosides reconnait ses cibles grâce à une complémentarité stérique et électrostatique à laquelle s'ajoutent des liaisons hydrogène impliquant les groupes polaires de la molécule [138].

II. L’identification d’aptamères : le procédé SELEX

En 1990, trois équipes ont simultanément décrit une procédure permettant, au sein d’une large bibliothèque d’oligonucléotides aléatoirement synthétisés, l’identification de molécules douées de propriétés prédéterminées comme une forte affinité envers une molécule cible [144,145] ou activité enzymatique [146]. Des cycles répétés, alternant sélection et amplification, ont permis de diriger l’évolution de la population de molécules selon un mode darwinien : seules les molécules présentant ces propriétés sont conservées. Ce procédé de sélection *in vitro* a été nommé SELEX (Selective Expansion of Ligands by EXponential enrichment). L’utilisation d’acides nucléiques dans une méthode combinatoire présente plusieurs intérêts. La diversité moléculaire des bibliothèques d’oligonucléotides surpasse les autres types de bibliothèques de plusieurs ordres de grandeur [147]. Les oligonucléotides possèdent également la remarquable propriété de pouvoir être aisément amplifiés. Depuis, de nombreuses publications ont décrit l’utilisation d’aptamères pour un large éventail d’applications qui exploitent la force et la spécificité de l’interaction avec leur cible. Les composés ciblés peuvent être aussi divers que des ions métalliques [148], des petites molécules organiques [141], des protéines [149] ou des cellules [150].

A. Principe général du procédé

Étant donné que la séquence d’un oligonucléotide dicte les repliements de sa chaîne dans l’espace, une bibliothèque d’oligonucléotides se présentera comme une population de formes, offrant d’éventuels sites de reconnaissance avec une multitude de groupements susceptibles de s’associer à un partenaire via différents types d’interactions non covalentes comme évoqué précédemment. Il est donc très probable que dans une population suffisamment riche se trouve une forme tridimensionnelle adaptée à la reconnaissance de la cible choisie. Le procédé SELEX permet l’identification de cette séquence par des cycles de sélection/amplification itératifs. Ce procédé et ses principales étapes sont présentés en figure 17.

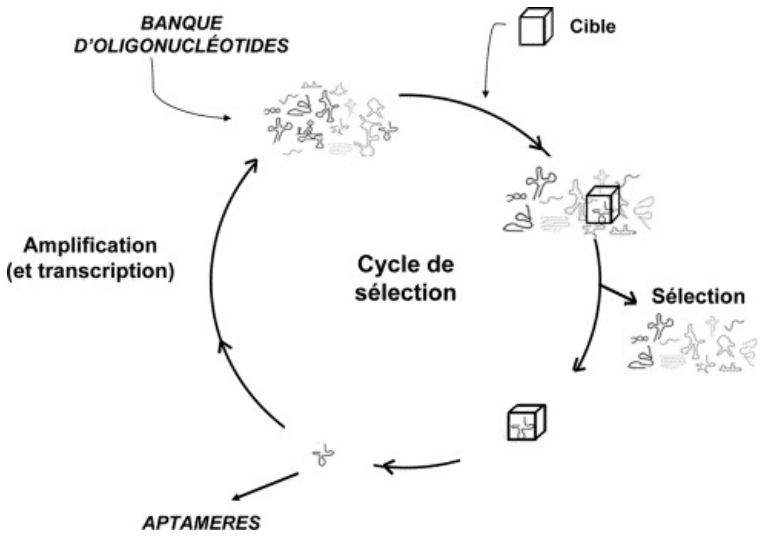


Figure 17 : Principe général de l'identification d'aptamères par le procédé SELEX [131]

La première étape du procédé SELEX est la synthèse aléatoire d'une banque d'oligonucléotides composée généralement de 10^{13} à 10^{15} séquences différentes. Pour l'identification d'aptamères en série ADN, cette banque est utilisée directement, alors qu'une conversion en une banque ARN est nécessaire pour l'identification d'aptamères en série ARN. La banque d'oligonucléotides est ensuite incubée avec la cible, et les oligonucléotides associés à la cible sont séparés de ceux non ou faiblement liés. Cette étape de sélection est cruciale pour l'orientation de l'évolution de la population vers des oligonucléotides ayant les propriétés souhaitées. Les oligonucléotides liés à la cible sont ensuite isolés et amplifiés par PCR (*polymerase chain reaction*) pour les ADN, ou par RT-PCR (*reverse-transcription polymerase chain reaction*) pour les ARN. Cette nouvelle banque enrichie d'oligonucléotides est utilisée pour un second cycle de SELEX. Généralement, entre 7 et 15 cycles sont nécessaires pour isoler les séquences ayant la plus grande affinité pour la cible.

B. Complexité de la bibliothèque d'oligonucléotides

La banque initiale de candidats est composée de séquences ADN synthétisées chimiquement, chacune comportant une région variable, longue de 20 à 80 nucléotides, flanquée aux extrémités 3' et 5' de régions fixes d'une vingtaine de nucléotides identiques pour tous les candidats de la banque. Ces régions fixes sont indispensables car elles servent d'amorces pour la PCR.

La taille de la portion variable détermine la diversité de la banque. En effet, le nombre de séquences possibles pour une région variable de n nucléotides est égal à 4^n, puisque chaque position peut être occupée par l'un des quatre nucléotides A, T, G ou C. Les séquences courtes sont plus faciles à obtenir et moins couteuses, mais les séquences plus longues offrent une plus grande diversité structurale. La limite expérimentale du nombre de séquences différentes dans une banque d'oligonucléotides est d'environ 10^{15}, soit celle d'une banque dans laquelle tous les candidats possédant une région variable de 25 nucléotides sont représentés [151]. Cela implique que si l'on choisit une banque de plus grande complexité structurale en manipulant des séquences de 30 nucléotides variables, ayant une diversité théorique d'environ 10^{18}, seules 1/1000 des séquences théoriques seront présentes dans la banque. Ainsi, plus n augmente, plus la proportion de séquences théoriques testées diminue. Néanmoins, même si cette proportion diminue, le nombre de séquences testées (10^{15}) reste constant et suffisant pour identifier des aptamères possédant l'affinité attendue. Il est estimé qu'environ une séquence sur 10^{11} de la banque possède cette propriété [152].

C. Étape de sélection

L'élimination des nucléotides non liés ou faiblement liés aux molécules cibles est une étape primordiale du procédé SELEX. Le plus souvent, un support greffé par la cible est utilisé comme phase stationnaire de chromatographie d'affinité ou dispersé dans le milieu sous forme de billes magnétiques pour retenir les aptamères les plus affins. Ces techniques sont relativement simples à utiliser et automatisables. Cependant, pour ces méthodes, l'immobilisation de la cible présente quelques inconvénients. En effet, la partie fixée de la molécule cible n'est plus disponible pour interagir avec les oligonucléotides, limitant par conséquent l'évolution vers des aptamères très affins. D'autres méthodes, pour le moment marginales, ne nécessitant pas l'immobilisation de la cible ont été développées comme la filtration sur membrane, la centrifugation, la cytométrie en flux, l'électrophorèse capillaire ou sur gel ainsi que la résonnance plasmonique de surface. Toutes ces techniques sont décrites dans la revue de Gopinath [153].

À mesure que les cycles se succèdent, les conditions de sélection doivent être de plus en plus sévères afin de réduire progressivement la population de séquences aux oligonucléotides les plus affins. La pression de la sélection peut être augmentée en réduisant la quantité de molécules cibles disponibles ou en modifiant les

conditions d'incubation ou de lavage (composition des solutions, volume ou temps d'incubation) [154].

Il est recommandé d'effectuer des cycles de contre sélection (Counter SELEX), consistants à faire des cycles sans la présence de la molécule cible, afin d'éliminer les oligonucléotides développant de fortes interaction non spécifiques avec les supports ou membranes. Il est également possible d'effectuer une contre sélection d'un épitope, si l'on veut par exemple que l'aptamère ne reconnaisse pas un analogue structural précis de la molécule cible. Un cycle de SELEX est alors effectué en incubant cet analogue à la banque d'oligonucléotides : ceux montrant de l'affinité pour cet analogue sont éliminés. Pour illustrer ce propos, on peut citer l'exemple de l'aptamère théophylline, pour lequel une contre sélection a été effectuée contre la caféine, qui ne diffère que par la présence d'un groupement méthyle supplémentaire. L'affinité de l'aptamère obtenu est dix mille fois moins importante pour la caféine que pour la théophylline.

D. Amplification des oligonucléotides sélectionnés

L'étape de sélection permet de conserver uniquement les oligonucléotides ayant une affinité suffisante pour la cible, déterminée par la pression de sélection appliquée. Ceux-ci ne représentent qu'une très faible proportion de la banque initiale. Une étape d'amplification, consistant à cloner les candidats sélectionnés, est donc nécessaire pour reconstruire une banque enrichie avant d'entamer un nouveau cycle. L'étape d'amplification permet, en outre, l'accroissement de la diversité des séquences testées. En effet, la banque d'oligonucléotides initiale ne contient qu'une faible proportion de la population théorique. Les enzymes utilisées en PCR engendrent naturellement un assez fort taux de mutations, environ une mutation tous les 20 000 nucléotides incorporés [131]. Ainsi, lorsqu'un oligonucléotide possédant un motif de reconnaissance de la cible est sélectionné, son amplification va générer des mutants de structure proche, non présents dans la banque de départ, et dont certains présentent peut être une meilleure affinité que l'oligonucléotide sélectionné. Par conséquent, ces mutations peuvent permettre l'évolution des candidats vers des descendants de plus forte affinité. Les conditions de sélection ne doivent cependant pas être trop sévères, au risque d'éliminer des oligonucléotides ayant une affinité moyenne mais dont des mutants auraient pu développer une très forte affinité. Inversement, avec des conditions trop douces, la minorité d'oligonucléotides à forte

affinité serait dominée par la grande majorité d'oligonucléotides à moyenne ou faible affinité, empêchant leur émergence lors de la sélection.

Un autre procédé de type SELEX, appelé « Non-SELEX » et constitué d'étapes de sélection répétées mais sans étapes d'amplification, a été décrit [155]. Quelques cycles sont suffisants pour sélectionner des aptamères affins d'une protéine, ce qui réduit considérablement le temps de sélection. Une constante de dissociation de 0,3 µM a été obtenue pour des aptamères sélectionnés contre la protéine h-Ras, valeur similaire à celle obtenue par un SELEX conventionnel (0,6 µM). Les principales limitations sont le nombre de cycles que l'on peut réaliser, pour le moment limité à trois ou quatre, et le plus faible nombre de candidats testés du fait de l'absence de mutations des séquences initiales.

E. Optimisation de la séquence des aptamères sélectionnés

Après le dernier cycle de SELEX, une cinquantaine d'oligonucléotides sélectionnés sont clonés et séquencés. Les séquences sont ensuite analysées afin de rechercher des motifs communs. Des séquences représentatives sont choisies et leur affinité envers la cible est mesurée par des expériences de dialyse à l'équilibre ou de résonnance plasmonique de surface. Des mutations et troncatures sont ensuite effectuées afin d'étudier leurs conséquences sur l'affinité. Cela permet d'identifier l'oligonucléotide avec la plus grande affinité, et avec la plus petite taille possible.

F. Modifications pré et post-SELEX

Une des limitations des oligonucléotides naturels est leur dégradation très rapide en milieu biologique, en particulier pour les ARN. Le groupement hydroxyle en position 2' du ribose attaque la liaison phosphoester voisine, menant à la cassure de l'oligonucléotide [152]. Cette réaction est favorisée à un pH légèrement basique et est catalysée par les nucléases présentes dans les milieux biologiques. Des modifications de la liaison phosphoester, du sucre ou du squelette phosphate-sucre conduisent à des aptamères résistants aux nucléases. Cependant, un changement de structure chimique d'un aptamère sélectionné sous forme ADN ou ARN, bien que sans impact pour certaines positions qu'il conviendra d'identifier, conduit généralement à une diminution voire à une perte des propriétés pour lesquelles il a été sélectionné [151]. Il est donc préférable d'effectuer le SELEX directement à

partir d'une banque d'oligonucléotides modifiés, mais cela implique que ces modifications doivent être compatibles avec les enzymes polymérases utilisées pendant l'étape d'amplification. L'approche de loin la plus employée est l'utilisation de nucléotides substitués en position 2' du ribose par des groupements amine, fluor ou méthyle-éther [131]. Une description détaillée des modifications possibles a été décrite par Kusser [156].

Une autre approche concerne l'utilisation d'isomères optiques [157]. Tous les acides nucléiques naturels sont des isomères D. Leurs énantiomères L sont résistants aux ribonucléases, mais également impossibles à produire ou à amplifier par les polymérases. Un SELEX effectué à partir d'une banque d'oligonucléotides en série L est donc impossible. L'énantiomère C' de la cible C doit être synthétisé et utilisé pour la sélection d'un aptamère naturel (série D). Une fois identifié, l'énantiomère L de cet aptamère est synthétisé chimiquement. Cet aptamère L, résistant aux nucléases, possèdera la même affinité pour la cible C que l'aptamère D pour C'. Ces aptamères énantiomériques sont appelés « Spiegelmers », du mot allemand « Spiegel » signifiant miroir.

G. Automatisation et miniaturisation du procédé

Les procédures SELEX conventionnelles sont relativement longues. Des protocoles automatisés sur des plates-formes robotisées ont été décrits, permettant la diminution de la durée de sélection de plusieurs semaines à quelques jours [158,159].

En 2006, Hybarger et ses collaborateurs ont présenté une plate-forme SELEX automatisée et miniaturisée pour la sélection d'aptamères anti-lysozyme [160]. Le dispositif est organisé en plusieurs modules, chacun réalisant une des étapes du protocole SELEX, reliés par des vannes contrôlées par ordinateur. L'aptamère identifié par ce dispositif miniaturisé a été comparé à celui sélectionné par un système automatisé mais non miniaturisé. Deux aptamères de séquence identique ont été obtenus (Kd non renseigné).

Plus récemment, la sélection automatisée d'aptamères sur puce a été décrite [161]. La puce est constituée de trois modules contrôlés par des micro-vannes et destinés à l'incubation, la séparation à l'aide de billes magnétiques, et à l'amplification des aptamères sélectionnés. La constante de dissociation de l'aptamère anti protéine C-réactive sélectionné lors de cette étude a été estimée à 3,51 nM après cinq cycles de sélection. La sélection d'aptamères sur ce

microsystème est plus rapide puisque 60 min suffisent pour effectuer un cycle de sélection, contre 160 min pour un SELEX traditionnel.

Ces dispositifs miniaturisés et automatisés présentent un formidable potentiel pour rendre le procédé SELEX plus rapide, mais surtout plus accessible en allant vers le développement de « kit SELEX » pouvant être employés par de nombreux utilisateurs.

H. Limitations de la procédure SELEX

Un des problèmes les plus fréquemment rencontrés est l'évolution de la population vers des aptamères non spécifiques. Afin de limiter ce phénomène, les cycles de contre-sélection doivent être multipliés et les conditions de sélection optimisées.

De plus, il n'existe pas de protocole SELEX standardisé, applicable pour n'importe quelle cible. Les conditions de sélections doivent être adaptées selon la cible étudiée, les caractéristiques voulues de l'aptamère et leur application [162].

Une autre propriété des aptamères néfaste pour leur sélection est leur polymorphisme [152]. En effet, une même séquence d'aptamère peut se replier en plusieurs conformères, dont tous ne sont pas capables de se lier à la cible. Cela implique que, lors des premiers cycles de SELEX, lorsque chaque séquence est présente en très peu d'exemplaires, si la conformation active n'est pas représentée, cette séquence sera éliminée. Pour minimiser ce phénomène, une étape de conditionnement des aptamères est nécessaire. Elle consiste à les dénaturer par chauffage, puis, une remise progressive à température ambiante favorise leur repliement en conformation active.

III. Propriétés et caractéristiques des aptamères

A. La taille

La séquence des aptamères sélectionnés par le procédé SELEX est constituée d'une partie variable et de deux parties fixes à leurs extrémités. Ces parties fixes peuvent allonger la séquence de 50 nucléotides. La séquence est ensuite optimisée par des essais de mutations et de troncatures, comme évoqué précédemment.

L'objectif étant d'obtenir l'aptamère le plus petit possible pour en diminuer le coût de production et minimiser les interactions non spécifiques qu'il peut développer. Généralement, la taille d'un aptamère est inférieure à 100 nucléotides. Un des aptamères les plus courts est l'aptamère anti-thrombine, constitué de 15 nucléotides [149]. La majorité des aptamères ont une taille comprise entre 25 et 40 nucléotides, comme par exemple l'aptamère fixant la guanine et la xanthine qui contient 32 nucléotides [163], l'aptamère anti-ochratoxine A qui est composé de 36 nucléotides [164] ou encore l'aptamère anti-cocaïne qui est constitué de 38 nucléotides [165]. Les aptamères les plus longs peuvent aller jusqu'à 100 nucléotides, comme l'aptamère spécifique d'une protéase à sérine du sang (la protéine C) dont la région minimale est de 99 nucléotides [166].

B. L'affinité

Le paramètre qui rend compte de l'affinité d'un aptamère envers sa cible est la constante de dissociation K_d. Plus la valeur de K_d est faible, plus l'affinité de l'aptamère pour sa molécule cible est forte. La constante d'affinité dépend de la solution dans laquelle elle a été mesurée (pH, concentration des ions, température). A l'heure actuelle, les séquences décrites sont majoritairement dirigées contre des cibles protéiques. Cependant, le nombre d'aptamères décrits pour des molécules de faible poids moléculaire n'est pas insignifiant. Le tableau 1 liste quelques exemples de cibles pour lesquelles un aptamère a été identifié. Généralement, pour des molécules d'intérêts de petite taille, les aptamères identifiés sont caractérisés par des constantes de dissociation de l'ordre du micromolaire. Par exemple, le K_d de l'aptamère anti-cocaïne est de l'ordre du micromolaire [167], celui de l'aptamère anti-ATP est de 6 µM [168] et celui de l'aptamère anti-dopamine est de 1,6 µM [169]. Concernant les cibles protéiques, des Kd de l'ordre du nanomolaire et même inférieures (picomolaire) sont plus fréquentes comme pour la thrombine (25 nM) [149], le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ou VEGF (~100 pM) [170] ou le facteur de croissance de kératinocyte ou KGF (~1 pM) [171]. Cette différence peut s'expliquer par le fait que la surface d'interaction d'une petite molécule est moins importante que celle d'une protéine.

Petites cibles				Macromolécules			
Cible	*ARN/ ADN*	K_d	*Ref*	*Cible*	*ARN/ ADN*	K_d	*Ref*
Arginine	ARN	330 nM	[172]	ARN Tar du VIH	ADN	50 nM	[173]
ATP	ADN	6 µM	[168]	VEGF	ARN	0.05-0.13 nM	[170]
Citrulline	ARN	62-68 µM	[175]	Cellule cancéreuse	ADN	0,8-229 nM	[176]
Cocaïne	ADN	< 5 µM	[167]	Hélicase de l'hépatite C	ADN	140 nM	[177]
Codéine	ARN	2,5 µM	[178]	IgE	ADN	8 nM	[179]
Dopamine	ARN	1,6 µM	[169]	KGF	ARN	0,3-3 pM	[171]
Ethanolamine	ADN	6-19 nM	[180]	Lactoglobuline	ADN	n.r.	[181]
FMN	ARN	0,5 µM	[142]	Ricine (toxine)	ADN	58-105 nM	[182]
Ibuprofène	ADN	1,5-5,2 µM	[183]	Sélectine	ADN	1,8-5,5 nM	[184]
Néomycine	ARN	100 nM	[185]	Spore d'anthrax	ADN	n.r.	[186]
Ni^{2+}	ARN	0,8-29 µM	[148]	Thrombine	ADN	200 nM	[149]
Ochratoxine A	ADN	49 nM	[164]				
Sulforhodamine B	ADN	190 nM	[187]				
Théophylline	ARN	100 nM	[141]				
TNT	ARN	n.r.	[188]				
Tobramycine	ARN	2-3 nM	[189]				
Xanthine	ARN	3,3 µM	[163]				
Cellobiose	ADN	600 nM	[174]				

Tableau 1 : Exemples d'aptamères sélectionnés et leurs constantes de dissociation. (n.r. : non renseigné). Inspiré de [162]

C. La spécificité

La mise en place de nombreux contacts intermoléculaires discriminants entre l'aptamère et sa cible rend cette liaison très spécifique. La spécificité peut être définie comme la capacité de discrimination entre des molécules de structure proche en compétition pour un ligand commun. La spécificité de nombreux aptamères a été décrite dans la littérature. Ainsi, l'aptamère sélectionné contre l'enzyme transcriptase inverse du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) est incapable de reconnaître les enzymes homologues du virus aviaire ou du virus murin [190]. L'aptamère anti-cocaïne ne reconnait pas son principal produit de dégradation, la

benzoylecgonine, pourtant seulement différente d'un groupement méthyle [165,167,191]. L'aptamère anti-OTA est lui aussi très spécifique puisque son affinité pour l'ochratoxine B est 100 fois plus faible que pour l'OTA, alors que ces deux molécules ne se différencient que par l'absence d'un atome de chlore sur l'ochratoxine B [164]. Pour les anticorps monoclonaux anti-OTA, la différence d'affinité entre ces deux molécules n'est que d'un facteur 3. Certains aptamères possèdent même l'étonnante capacité de discriminer des énantiomères. Une différence d'affinité d'un facteur 3 a été obtenue entre la L- et la D-citrulline [175], et même un facteur 12 000 entre la L- et D-arginine [172].

Cette spécificité peut être une propriété imposée par les conditions choisies lors du SELEX grâce aux cycles de contre sélection. L'exemple le plus connu est l'aptamère sélectionné contre la théophylline. L'utilisation de cycles de contre sélection avec la caféine, comme déjà évoqué, a permis d'obtenir une différence d'affinité entre ces deux molécules d'un facteur 10 000 [141]. Cette différence d'affinité est dix fois plus importante que celle observée avec les anticorps dirigés contre la même cible.

De telles capacités de discrimination ne sont cependant pas observées pour tous les aptamères. Par exemple, les aptamères sélectionnés contre le coenzyme A reconnaissent aussi l'AMP [192] ; ceux sélectionnés contre la xanthine reconnaissent la guanine [163] ; ceux sélectionnés contre le facteur de croissance des plaquettes sanguines humaines reconnaissent leurs homologues murins [193] ; et ceux sélectionnés contre la cellobiose reconnaissent la cellulose [174].

Contrairement aux anticorps, cette réactivité croisée peut être contrôlée voire même prédéterminée en utilisant une procédure de sélection appelée Toggle SELEX. Durant la sélection, les cibles d'intérêt sont alternativement utilisées pour les différents cycles du SELEX. Les aptamères sélectionnés développeront donc de l'affinité pour toutes les cibles utilisées. Cette stratégie a été employée lors de la sélection d'un aptamère dirigé contre la thrombine humaine et la thrombine porcine. L'aptamère obtenu présente les mêmes propriétés envers les deux protéines [194].

D. Comparaison avec les anticorps

De nombreuses applications analytiques, thérapeutiques ou de diagnostique précédemment basées sur l'utilisation d'anticorps, se développent désormais avec des aptamères en raison de leurs caractéristiques d'affinité et de spécificité. Un

certain nombre de limitations que l'on peut observer avec les anticorps sont absentes lorsque l'on utilise les aptamères.

Le principal avantage découle du mode de production des aptamères. En effet, leur sélection in vitro ne requiert aucun système animal ni aucune culture cellulaire. Il n'y a donc pas de contrainte quant à la sélection d'aptamères dirigés contre des molécules cibles faiblement immunogènes ou toxiques, ce qui est problématique pour la production d'anticorps.

De plus, la production in vivo d'anticorps limite l'identification à ceux capables de reconnaître leur cible dans des conditions physiologiques. Les conditions de sélection des aptamères peuvent quant à elles être choisies afin de tenir compte du milieu dans lequel ils seront utilisés. Ces conditions de sélection peuvent également être ajustées afin de faire évoluer la population vers les propriétés d'affinité, de spécificité ou de réactivité-croisée recherchées (cf section précédente).

Les aptamères sont produits par synthèse chimique rapide, et peu coûteuse et sont ensuite purifiés. Aucune variation de lot à lot n'est donc observée contrairement aux anticorps. La synthèse chimique des aptamères permet également l'introduction de modifications afin d'améliorer leur stabilité ou leur affinité, ou pour faciliter leur immobilisation ou leur détection.

Le développement de protocoles SELEX automatisés permet l'identification très rapide d'aptamères, alors que l'immunisation d'un animal peut durer plusieurs mois. Lors du SELEX, les cibles peuvent également être immobilisées de manière orientée pour favoriser la reconnaissance d'une de leur région spécifique.

D'autre part, la dénaturation des anticorps par un solvant organique ou par la température peut être irréversible, contrairement aux aptamères qui peuvent retrouver leur conformation active au bout de quelques minutes après dénaturation. Lors de l'appariement d'un aptamère avec la cible, un changement conformationnel s'opère. Ce phénomène a été exploité pour le développement de nouvelles méthodes bioanalytiques dont la détection est basée sur ce changement conformationnel (cf section IV B).

La taille plus réduite des aptamères, qui représente environ un dixième de celle des anticorps [195], permet un greffage plus dense sur un support.

La principale limitation actuelle des aptamères est le nombre encore limité de cibles pour lesquelles un aptamère a été sélectionné. Cependant, cette technologie est très jeune et en plein essor, la multiplication des applications et les récentes avancées du procédé SELEX démontrent leur grand potentiel.

IV. Applications

A. Les applications thérapeutiques [131]

Pour les aptamères sélectionnés contre les protéines, la liaison formée engendre très souvent l'inhibition de la fonction de la protéine. Cette propriété est largement exploitée comme outil pharmacologique pour la validation de cibles dans le cadre de la recherche de médicaments.

Un autre intérêt de l'utilisation d'acides nucléiques comme ligand de biomolécules intracellulaires réside dans le fait que ces aptamères peuvent être directement synthétisés à l'intérieur de la cellule par son propre matériel génétique. Ces aptamères sont alors appelés intramères [196]. Par exemple, des aptamères sélectionnés contre la VIH-1 Rev, protéine nécessaire à la réplication du virus d'immunodéficience humaine (VIH-1), ont permis l'inhibition de la production du VIH dans une culture cellulaire [197].

L'aptamère sélectionné contre la thrombine, protéine intervenant dans la coagulation sanguine, possède un fort potentiel thérapeutique. Lorsque cet aptamère est perfusé, la liaison de l'aptamère avec sa cible a un effet anticoagulant [198]. La rapide dégradation de l'aptamère par les nucléases est ici un avantage puisque l'effet anticoagulant disparait quasi instantanément après la fin de la perfusion d'aptamères. Cette propriété est très intéressante puisque le risque majeur lors de l'utilisation d'anticoagulants est la réversion trop lente de l'effet pouvant provoquer un saignement incontrôlable. Un aptamère dirigé contre le facteur de coagulation IXa a également été sélectionné, contrairement à l'exemple précédent, à partir d'une banque d'oligonucléotides modifiés résistants aux nucléases. Pour moduler l'effet anticoagulant, les auteurs ont utilisé un oligonucléotide appelé « antidote », de séquence complémentaire à celle de l'aptamère, et qui, en s'associant à celui-ci, libère la molécule cible et annule l'effet anticoagulant [199].

Les aptamères peuvent également assurer le transport d'une molécule active à laquelle ils sont associés vers sa cible. Ainsi, l'aptamère dirigé contre l'élastase neutrophile humaine ne provoque pas l'inhibition de la protéine lorsqu'il s'y fixe. Cependant, lorsqu'un peptide inhibiteur de cette protéine est fixé de manière covalente à l'aptamère, l'effet inhibiteur est 100 000 fois plus important que lors de la mise en présence du peptide seul [200].

Plusieurs dizaines d'aptamères sont actuellement en développement contre diverses pathologies (cancer, inflammation, maladies auto-immunes, etc.) et ont

montré des effets positifs sur des modèles animaux [201]. Une dizaine d'aptamères sont en phase d'essai clinique, et un médicament constitué d'un aptamère dirigé contre le facteur d'angiogenèse VEGF (Macugen) est disponible depuis 2006 pour traiter la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

B. Les applications analytiques

1. Les biocapteurs ou « aptasensors »

L'étude et la compréhension des mécanismes menant à fixation d'un aptamère à sa cible a conduit au développement de capteurs exploitant leur propriété d'affinité, de stabilité, et de spécificité. Les biocapteurs sont constitués d'un élément de reconnaissance moléculaire fixant de manière spécifique l'analyte recherché, et d'un transducteur pour que la liaison du récepteur à sa cible entraîne l'apparition d'un signal physique quantifiable. Une des caractéristiques des biocapteurs est que l'élément de reconnaissance et le transducteur doivent être en contact direct [202]. Concernant les aptasensors, l'élément de reconnaissance utilisé est un aptamère. Le changement conformationnel des aptamères lors de leur fixation à leur cible est exploité dans la conception de la plupart de ces capteurs.

Les capteurs à base d'aptamères peuvent être classés selon la nature du transducteur utilisé. Le tableau 2 présente et permet de comparer les différents capteurs qui seront cités en exemple.

Cible	Matrice	LDD	Temps d'analyse	Temps de régénération	Ref
Capteurs électrochimiques					
Thrombine	Sérum	20 nM	3 h	8 min	[203]
Cocaïne	Sérum, salive	10 µM	4 min	6 min	[204]
Cocaïne	Sérum	1 µM	2 min	n.r.	[111]
Cocaïne	Tampon dopé par héroïne et caféine	1 nM	4 min	8 min	[205]
Cocaïne	Tampon	1 µM	20 min	25 min	[206]
Capteurs optiques					
Thrombine	Tampon	5 nM	10 min	1 min	[207]
Ochratoxine A	Tampon dopé par N-acetyl-phenyl-alanine et warfarine	5 nM	30 secs	Usage unique	[208]
Cocaïne	Sérum	10 µM (sérum)	30 secs	Usage unique	[165]
Cocaïne	Tampon	0,5 µM	n.r.	Usage unique	[209]
Cocaïne	Tampon	0,1 mM	30 min	Usage unique	[210]
Cocaïne	Tampon	25 µM	1 min	Usage unique	[211]
Cocaïne	Tampon	0,5 µM	15 min	Usage unique	[167]
Capteur sensibles aux variations de masses					
Rétinol	Sérum artificiel	75 nM	30 min	n.r.	[100]
Thrombine	Tampon	1 nM	10 min	n.r.	[212]
Polymerase Taq de l'ADN	Lysat d'E. Coli	n.r.	n.r.	n.r.	[213]

Tableau 2 : Exemples d'aptasensors. (LDD : limite de détection en milieu pur, n.r. : non renseigné)

a. Les capteurs électrochimiques

Pour ce type de capteurs, des aptamères à l'extrémité desquels est fixée une espèce électrochimiquement active sont immobilisés sur une électrode.

L'association de l'aptamère à sa cible entraîne un changement conformationnel qui influe sur le transfert électronique entre l'espèce électro-active et l'électrode. Un capteur de thrombine a été conçu en suivant cette approche [203]. Des aptamères anti-thrombine fonctionnalisés par du bleu de méthylène, jouant ici le rôle d'espèce électro-active, ont été immobilisés sur une électrode d'or. En l'absence de sa cible, la flexibilité de l'aptamère permet le contact entre le bleu de méthylène et l'électrode, induisant l'apparition d'un courant. En présence de thrombine, la structure de l'aptamère se replie et éloigne le bleu de méthylène de l'électrode, ce qui empêche le transfert électronique (figure 18 A). La limite de détection de cette méthode, qui nécessite une durée d'incubation de 3 heures, a été estimée à 20 nM en milieu pur. Cependant, appliqué à un milieu réel, il est apparu difficile de distinguer un signal spécifique d'un signal lié à des composés interférents ou à une dégradation du capteur.

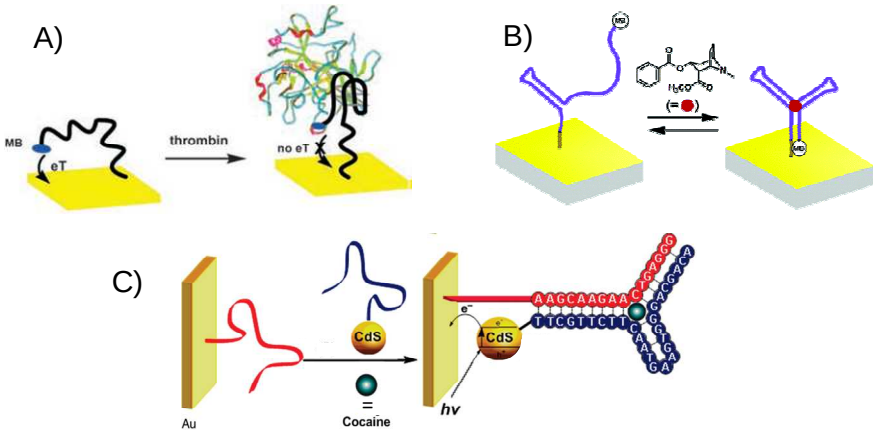


Figure 18 : Représentation schématique du fonctionnement d'un capteur électrochimique à thrombine (A) [203], et de deux capteurs à cocaïne (B) [204] et (C) [206]

Des aptasensors basés sur une augmentation du signal ont par la suite été développés. On peut citer, à titre d'exemple, le cas d'un capteur de cocaïne conçu en immobilisant un aptamère anti-cocaïne fonctionnalisé par du bleu de méthylène sur une électrode d'or et dont le fonctionnement est schématisé en figure 18 B [204]. En absence de cocaïne, la structure de l'aptamère, stabilisée par une tige-boucle, rend inaccessible le bleu de méthylène à l'électrode. En revanche, la présence de cocaïne engendre la formation de trois tiges appariées qui permettent un rapprochement entre le bleu de méthylène et l'électrode. Un signal positif proportionnel à la concentration de cocaïne est alors observé. Une limite détection de 10 µM a été obtenue en milieu pur, et des concentrations de 500 µM dans du sérum et de la salive ont conduit à un signal positif. Ce capteur a récemment été miniaturisé et intégré au sein d'un système microfluidique [111]. Une sensibilité de l'ordre de 10 µM a été atteinte dans des échantillons de sérum.

Li et ses collaborateurs ont adapté cette stratégie en remplaçant le bleu de méthylène par un groupement chimiluminescent par électro-activation, le Ru(bpy)2(dcbpy)NHS [205]. La proximité de ce groupement avec l'électrode engendre un signal de luminescence en présence de cocaïne, ce qui permet sa quantification. Une très bonne sensibilité a été obtenue puisque une limite de détection de 1 nM a été obtenue en milieu pur. Ce capteur n'a cependant pas été testé en milieu réel.

Une approche très semblable à celle des capteurs de cocaïne décrits précédemment a été utilisée par Golub et ses collaborateurs [206]. L'aptamère anti-cocaïne a été scindé en deux sous unités, l'une immobilisée sur une électrode d'or et l'autre fonctionnalisée par une nanoparticule de sulfure de cadmium (figure 18 C). En présence de cocaïne, le complexe entre les deux sous unités de l'aptamère et la cocaïne se forme à la surface de l'électrode. La photo-excitation des nanoparticules favorise ensuite le transfert électronique entre les nanoparticules et l'électrode, induisant ainsi l'apparition d'un courant. L'avantage principal de l'utilisation d'un aptamère scindé en deux sous-unités est l'importante réduction du bruit de fond. Avec cette approche, une limite de détection de l'ordre du micromolaire a été atteinte en milieu pur.

Des « aptasensors » électrochimiques basés sur la spectroscopie d'impédance ou sur les transistors à effet de champ, permettant l'utilisation d'aptamères non fonctionnalisés (ou « label-free aptasensors »), ont également été développés. La plupart de ces capteurs mettent en jeu des espèces électroactives présentes en solution, et dont l'accès à l'électrode sera limité ou accentué par l'association de l'aptamère à sa cible. Plusieurs revues montrent que cette méthode, pour le moment moins répandue, semble cependant prometteuse [206,214].

b. Les capteurs optiques

Les aptamères sont également fréquemment utilisés comme outils de reconnaissance moléculaire dans les biocapteurs optiques. Les techniques de détection les plus populaires sont la fluorescence et la colorimétrie.

i. Les capteurs fluorescents

Un aptasensor optique pour la détection de la thrombine a été décrit par Potyrailo et ses collaborateurs [207]. La fixation de la thrombine sur son aptamère, marqué par la fluorescéine en 5' et immobilisé de façon covalente sur un support, entraîne une variation d'anisotropie de fluorescence. En effet, l'augmentation de la taille liée à la fixation de la thrombine conduit à une modification de la vitesse de

rotation et donc à une modification de l'anisotropie de fluorescence. Une limite de détection de 5 nM a été obtenue en milieu pur. Les performances du capteur en milieu réel n'ont pas été étudiées.

Un capteur d'ochratoxine A, basé sur le même principe de variation d'anisotropie de fluorescence, a récemment été conçu [208]. Un court oligonucléotide marqué par un fluorophore et complémentaire d'un segment de la séquence de l'aptamère anti-OTA est utilisé. Cet oligonucléotide marqué, d'abord apparié à l'aptamère, est libéré lors du changement conformationnel causé par la fixation de l'OTA. La mesure de variation d'anisotropie de l'oligonucléotide marqué permet la quantification de l'OTA. Une limite de détection de 5 nM a été obtenue dans un milieu pur. Aucune analyse d'échantillon réel n'a été effectuée.

Les balises moléculaires à base d'aptamères (« aptabeacon ») constituent un autre format très fréquemment utilisé. La détection est basée sur le transfert d'énergie de fluorescence (ou FRET pour « Fluorescence Resonance Energy Transfert ») entre deux fluorophores. L'aptamère est dans ce cas fonctionnalisé par deux groupements : un fluorophore et un inhibiteur de fluorescence, chacun étant situé à une extrémité de la séquence. Une modification de la distance entre le fluorophore et l'inhibiteur, liée au réarrangement structural consécutif à l'association ou la dissociation de la molécule cible, entraîne une variation de l'intensité de fluorescence. Un capteur de cocaïne a été conçu sur ce principe [165]. Comme déjà évoqué précédemment, la structure secondaire de l'aptamère anti-cocaïne est constituée de trois tiges-boucles, à la jonction desquelles se trouve le site de fixation de la cocaïne. La tige portant les groupements optiquement actifs a été raccourcie afin de la déstabiliser et ainsi séparer le fluorophore de son inhibiteur. Comme l'illustre la figure 19, la liaison avec la cocaïne stabilise la structure et permet à la tige de se reformer, provoquant le rapprochement du fluorophore de son inhibiteur, et donc une extinction de fluorescence. Une limite de détection de 10 µM a été obtenue dans le sérum.

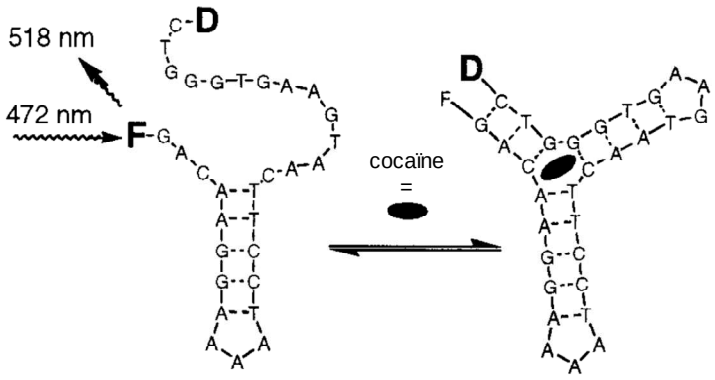


Figure 19 : Capteur de cocaïne par inhibition de fluorescence [165]. (F : fluorescéine, D : inhibiteur de fluorescence)

Récemment, des boîtes quantiques (ou « quantum dots ») ont été employées à la place de molécules organiques fluorophores pour la conception de ce type de capteurs [215]. Un capteur de cocaïne de ce type a d'ailleurs été décris par Zhang et ses collaborateurs [209]. Une limite de détection de 0,5 µM a été obtenue en milieu pur mais aucun échantillon réel n'a été testé sur ce capteur.

ii. Les capteurs colorimétriques

Pour ce type de capteurs, la fixation entre l'aptamère et sa cible se traduit par un changement de couleur du milieu réactionnel. Ces capteurs colorimétriques présentent l'avantage de pouvoir être utilisés sans instrument de détection puisque le changement de couleur est visible à l'œil nu. Ils possèdent donc un énorme potentiel pour une utilisation sur site. La plupart des « aptasensors » colorimétriques décris dans la littérature utilisent des nanoparticules d'or (ou « AuNP ») comme indicateur coloré. En effet, ces nanoparticules ont la propriété de passer du rouge au bleu lorsqu'elles s'agrègent. Deux exemples de capteurs de cocaïne illustrent cette approche.

Un aptamère anti-cocaïne a été scindé en deux sous-unités qui ont été fixées sur des nanoparticules différentes [210]. Sans cocaïne, les nanoparticules restent isolées et donnent à la solution une couleur rouge. En présence de cocaïne, les deux sous-unités de l'aptamère se rassemblent autour de celle-ci, induisant la formation d'agrégats de nanoparticules de couleur bleue. La figure 20 illustre ce mécanisme de détection. Une limite de détection de 100 µM a été obtenue en milieu pur.

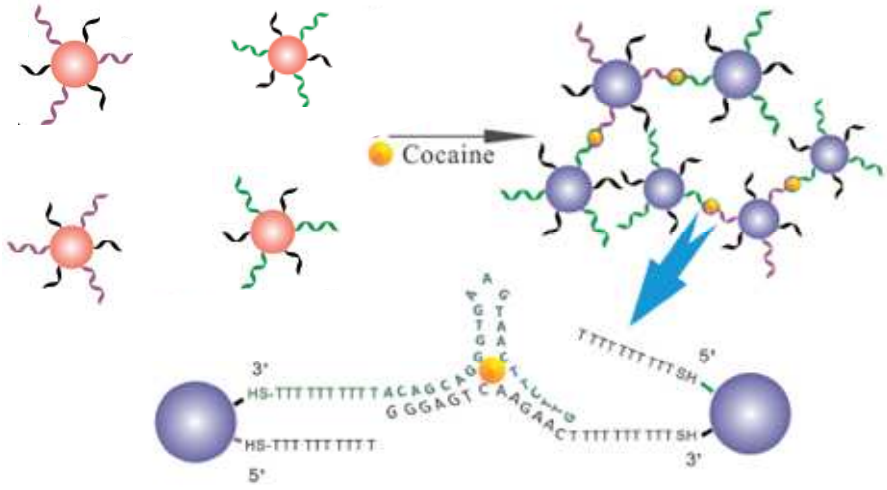


Figure 20 : Capteur colorimétrique de cocaïne basé sur l'agrégation de nanoparticules d'or en présence de cocaïne. Adapté de [210]

Un deuxième exemple, plus performant, et basé sur le même principe, a été exposé par Liu [211]. L'aptamère est ici utilisé comme oligonucléotide de liaison pour assembler les nanoparticules fonctionnalisées par des oligonucléotides complémentaires des extrémités de la séquence de l'aptamère. En présence de cocaïne, le changement de conformation de l'aptamère rompt son appariement avec l'oligonucléotide lié à la nanoparticule. Ainsi, les nanoparticules agrégées, de couleur bleue avant fixation de la cible, se dispersent et donnent une couleur rouge à la solution après fixation de la cible (figure 21). Une limite de détection de 25 µM a été obtenue en milieu pur.

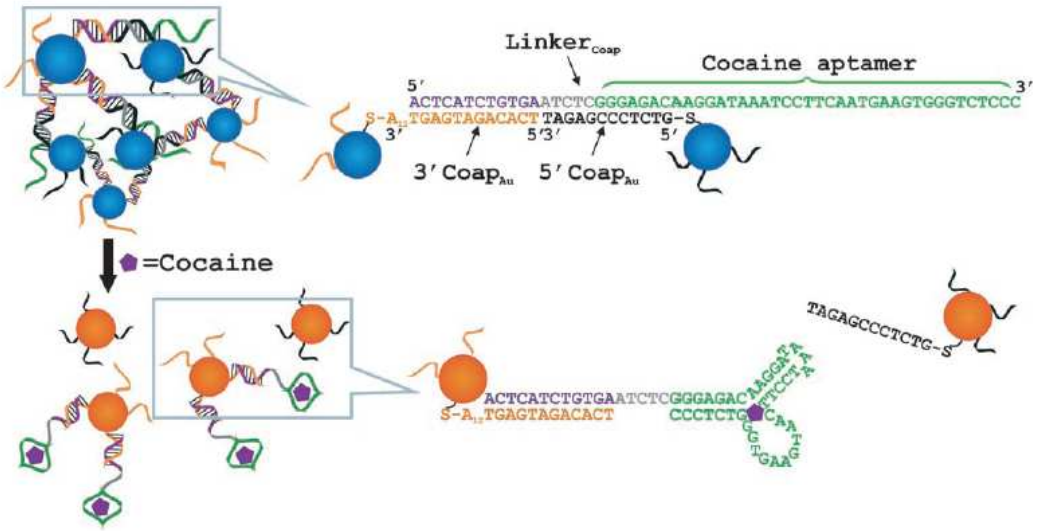


Figure 21 : Représentation schématique de la détection colorimétrique de la cocaïne basée sur la dispersion de nanoparticules liées par l'aptamère anti-cocaïne [211]

Un autre capteur colorimétrique de cocaïne couplé à un spectrophotomètre a permis d'atteindre une meilleure sensibilité que les capteurs à fluorescence [167] (figure 22). Les auteurs ont exploité la capacité qu'ont certains chromophores à se fixer aux oligonucléotides. Ainsi, après incubation de l'aptamère avec un chromophore, le changement conformationnel lié à la fixation de la cocaïne déplace le chromophore et modifie ainsi ses propriétés d'absorbance. La sensibilité observée s'est avéré légèrement meilleure que pour les capteurs basés sur l'utilisation d'aptamères anti-cocaïne fonctionnalisés par des molécules fluorescentes. En effet, une limite de détection de 0,5 µM a été obtenue en milieu pur, indiquant que la fixation non covalente du chromophore n'a pas d'impact sur l'affinité de l'aptamère, contrairement aux fixations covalentes des fluorophores et au raccourcissement d'une tige effectués pour le capteur à fluorescence.

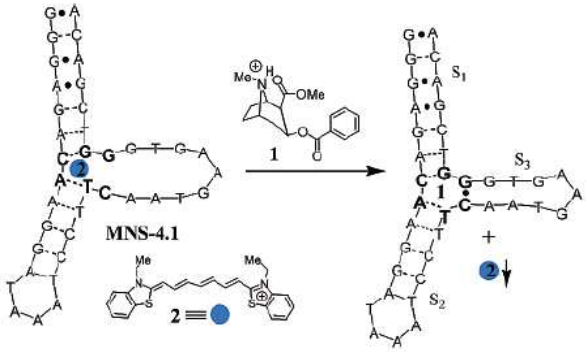


Figure 22 : Principe du capteur colorimétrique à cocaïne basé sur le déplacement d'un chromophore [167]

Cette stratégie est cependant risquée pour l'analyse d'échantillons complexes. En effet, il est probable que le chromophore, fixé à l'aptamère par des interactions non spécifiques, soit déplacé en milieu réel par une autre molécule développant des interactions non spécifiques avec l'aptamère.

c. Les capteurs sensibles aux variations de masse [216]

Ce type de capteur est fondé sur la détection d'un changement de masse associé à la liaison ou à la dissociation d'un ligand sur un récepteur immobilisé sur une surface sensible. Ces méthodes ont l'avantage de ne nécessiter aucun marquage.

La résonnance plasmonique de surface, très utilisée durant le procédé SELEX pour évaluer l'affinité des candidats au cours des cycles, peut être employée pour la conception de capteurs à base d'aptamères. La variation de l'indice de réfraction mesurée au voisinage de l'interface est proportionnelle au nombre de ligand se fixant aux aptamères immobilisés sur la surface. Cette méthode a

notamment été utilisée pour construire un capteur de la protéine Tat du VIH-1 [217], ou du rétinol (RBP4), bio-marqueur du diabète de type 2, pour lequel la sensibilité observée s'est montrée meilleure qu'avec les tests ELISA [100].

La microbalance à quartz est également utilisée pour détecter l'interaction d'un aptamère avec sa cible. La fixation d'un aptamère, immobilisé sur le cristal de quartz, avec sa cible entraîne une diminution de la fréquence de résonance du cristal. Un capteur de thrombine [212] a été décrit avec une limite de détection de 1 nM en milieu pur. Les propriétés des cristaux de quartz sont aussi exploitées pour la conception de capteurs à onde acoustique de surface (ou « Surface Acoustic Wave ») [218].

Des capteurs utilisant des microleviers ou « microcantilevers » sur lesquels sont immobilisés des aptamères ont été développés. La fixation de la cible à son aptamère entraine ici la courbure des microcantilevers induisant un signal. Un capteurs de la polymérase Taq de l'ADN [213] utilise cette méthode et une limite de détection de 50 nM a été obtenue dans un lysat d'E. Coli.

d. Discussion

Le potentiel des aptasensors est considérable car ils proposent une méthode d'analyse réalisable sur site, ne nécessitant aucun réactif et constitué d'une seule étape qui lui confère une très grande simplicité d'utilisation. D'autre part, les études portant sur ce domaine sont de plus en plus nombreuses.

Ces quelques exemples montrent cependant que les limites de détection des capteurs varient énormément selon les formats et les cibles choisies. Les capteurs de cocaïne sont généralement moins sensibles que ceux développés pour d'autres analytes, le K_d relativement élevé de l'aptamère anti-cocaïne en est le facteur limitant. Seul le capteur développé par Li et ses collaborateurs, basé sur une amplification chimiluminescente électro-activée, possède une sensibilité (1 nM, [205]) inférieure au seuil de détection légal de la cocaïne dans le sang, fixé à 0,16 µM (soit 50 ng/mL [9]). Les auteurs n'ont cependant pas évalué le comportement de ce capteur en milieu réel. Concernant le capteur anti-ochratoxine A, sa limite de détection est égale à la concentration maximale autorisée dans le vin. Ici encore, seuls des milieux purs ont été testés. Les temps d'analyse et de régénération des capteurs peuvent également être problématiques si une réponse rapide est nécessaire, comme pour les analyses cliniques.

Malgré une procédure légèrement plus fastidieuse, des dispositifs mettant en jeu des étapes de fixation de l'analyte à l'aptamère, de lavage et d'amplification du signal permettent généralement d'atteindre de meilleures sensibilités. Comme la

reconnaissance de la cible n'entraîne pas directement l'apparition d'un signal, on ne parle plus de capteurs mais de bioessais.

2. Les bioessais à base d'aptamères

Étant donnée la grande diversité des cibles disponibles, différentes configurations de bioessais mettant en œuvre des aptamères ont été décrites et sont présentées en figure 23.

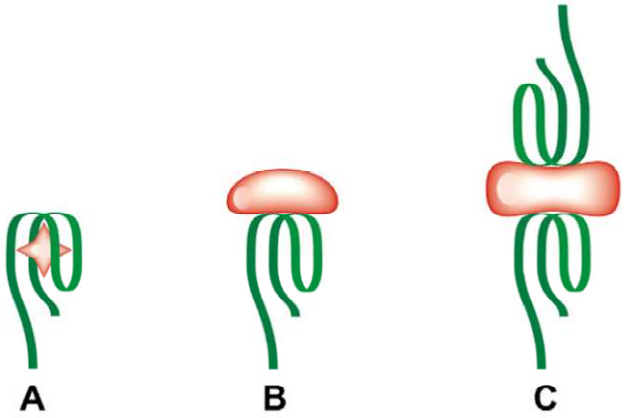


Figure 23 : Formats utilisés par les bioessais utilisant des aptamères. (A) : Format à un seul site pour la détection d'une petite molécule ; (B) : Format à un seul site pour la détection d'une macromolécule ; Format à deux site (type « sandwich ») pour la détection d'une macromolécule. Adapté de [216]

Pour les petites molécules organiques, seul le format à un seul site est possible puisque l'aptamère, en enveloppant en grande partie sa cible, empêche la fixation d'un deuxième aptamère sur celle-ci (cf figure 23A). Pour les macromolécules comme les protéines, qui peuvent présenter plusieurs sites de liaison pour leur aptamère, un format à un seul site (figure 23B) ou un format à deux sites de type « sandwich » (figure 23C) est possible. Dans ce cas, un aptamère immobilisé sur un support solide capture la cible puis un aptamère traceur marqué permet la détection de la cible fixée par l'aptamère de capture. Si la protéine possède deux sites de fixation identiques (comme les protéines multimériques) l'utilisation d'un même aptamère pour la capture et pour la détection est possible. Cependant, dans la plupart des cas, deux aptamères différents sont utilisés afin qu'ils se positionnent sur deux sites de liaison différents de la protéine [216].

Les différents bioessais décrits dans cette partie sont reportés dans le tableau 3.

Cible	Détection	Matrice	LDD	Ref
Antigène de la bactérie F. tularensis	Colorimétrique	Tampon	1700 bactéries/mL	[219]
Cocaïne	Œil nu	Sérum	0,2 mM	[220]
IgE	Electrophorèse capillaire / Fluorescence induite par laser	Sérum	46 pM	[221]
Thrombine	Electrochimique	Tampon	1 nM	[222]
Thrombine	Electrochimique	Tampon	3,5 nM	[223]
Thrombine	Electrochimique	Tampon	1 nM	[224]
Thrombine	Résonnance plasmonique de surface	Tampon	0,5 pM	[225]
Thyroxine	Colorimétrie	Tampon	n.r.	[226]
TNT	Optique	Extraits de sols	1 pM	[188]
VEGF	Chimiluminescence	Sérum	25 pg/mL (soit ~ 0,6 pM)	[227]
VEGF	Résonnance plasmonique de surface	Tampon	1 pM	[225]

Tableau 3 : Exemples de bioessais à base d'aptamères

Des bioessais inspirés de la technique ELISA (pour « enzyme linked immunosorbent assay ») et utilisant des aptamères à la place des anticorps ont vu le jour. Ce type de bioessais se retrouve sous plusieurs dénominations dans la littérature : ELONA (pour « enzyme linked oligonucleotide assay » qui est l'acronyme le plus courant, ELAA (pour « enzyme linked aptamer assay ») ; ELOSA (pour « enzyme linked oligosorbent assay ») ou encore ALISA (pour « Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay »). De la même façon qu'avec les anticorps pour les tests ELISA, les tests ELONA en format « sandwich » mettent en jeu des aptamères de capture, immobilisés au fond des puits d'une microplaque, pour fixer la molécule cible, et un aptamère marqué pour détecter le complexe aptamère de capture/cible formé. Des aptamères sélectionnés contre un antigène de bactérie, la *F. tularensis*, ont été utilisés pour la conception d'un test ELONA [219].

La sensibilité obtenue, uniquement évaluée en milieu pur, s'est avérée meilleure qu'avec le test ELISA correspondant.

Des tests hybrides ELISA/ELONA ont été développés, en utilisant des anticorps pour la capture et des aptamères pour la détection, ou inversement [228]. Un aptamère anti-VEGF pour la détection, couplé à un anticorps pour la capture ont été utilisés pour la détection du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire dans le sérum [227]. Les performances de ce test hybride se sont montrées comparables à celles du test ELISA classique. Les formats d'ELISA par compétition ont également été transposés à la technique ELONA [226]. Pour ce format, la molécule cible, la thyroxine, est immobilisée et mise en présence de l'échantillon auquel des aptamères biotinylés ont été ajoutés. Après lavage, les complexes cibles/aptamères sont révélés par l'ajout d'une enzyme liée à de la streptavidine. L'intensité du signal est donc ici inversement proportionnelle à la concentration de molécule cible dans l'échantillon. La limite de détection du système n'a pas été évaluée.

Des enzymes, des catalyseurs organiques ou inorganiques, ou des nanoparticules, peuvent également être utilisés pour amplifier le processus de reconnaissance avant une détection électrochimique. Par exemple, la peroxydase de raifort (ou « horseradish peroxydase ») a été utilisée pour l'amplification de la détection ampérométrique de la thrombine [223]. Dans un format de type compétitif indirect, une électrode d'or est fonctionnalisée par de la thrombine, et est mise en contact avec l'échantillon auquel du peroxyde d'hydrogène et des aptamères anti-thrombine biotinylés ont été ajoutés. Les aptamères non liés à la thrombine présente dans l'échantillon se fixent à celle immobilisée sur l'électrode. Ensuite, l'incubation de l'enzyme couplée à de la streptavidine permet la révélation des complexes formés. L'enzyme catalyse la réduction d'H_2O_2 qui, via un médiateur électrochimique, induit l'apparition d'un signal ampérométrique. Une limite de détection de 3,5 nM a été observée en milieu pur. Polsky et ses collaborateurs ont d'ailleurs proposé un capteur sur ce principe, également pour la thrombine, mais en substituant l'enzyme par des nanoparticules de platine, également catalyseurs de la réduction du peroxyde d'hydrogène [224]. Une limite de détection de l'ordre du nanomolaire a également été obtenue. Un essai ELONA direct par déplacement avec détection électrochimique a été également mis au point [222]. Ce format est fondé sur le fait que les aptamères possèdent une affinité moins importante envers leur molécule cible conjuguée à une enzyme qu'envers leur molécule cible non modifiée. Les aptamères anti-thrombine sont immobilisés dans une microplaque et mis en contact de leur cible conjuguée à une enzyme. Lors de l'incubation de l'échantillon, les cibles non modifiées vont déplacer les cibles modifiées ayant une affinité

inférieure pour l'aptamère, ce qui conduit, après lavage, à une diminution du signal. En milieu pur, la limite de détection obtenue est de l'ordre du nanomolaire.

Un bioessai basé sur l'utilisation d'une fibre optique pour la détection d'explosifs a été récemment décrit. Un format compétitif indirect a été choisi. La surface de la fibre optique a été fonctionnalisée par des molécules de TNT immobilisées de manière covalente. Des aptamères sélectionnés contre le TNT marqués par un fluorophore sont ajoutés à l'échantillon. Les aptamères non fixés par les molécules de TNT présentes dans l'échantillon se fixent à la surface de la fibre. Après lavage, un signal d'intensité inversement proportionnel à la concentration de TNT dans l'échantillon est mesuré. La sensibilité obtenue s'est avérée meilleure que pour les tests ELISA développés pour cette molécule. Une limite de détection de l'ordre du picomolaire a été rapportée [188]. De plus, des analyses du TNT dans des extraits de sols ont montrées une bonne concordance avec les résultats obtenus par chromatographie liquide, ce qui témoigne de l'absence d'effets de matrice.

Des bioessais impliquant une détection par résonnance plasmonique de surface et amplification enzymatique ont été développés pour la thrombine et pour le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*VEGF*). L'enzyme catalyse une réaction de précipitation afin d'amplifier le signal, permettant d'obtenir des limites de détection respectivement de 0,5 pM et 1 pM en milieu pur [225].

L'électrophorèse capillaire (EC) peut être utilisée pour séparer un mélange d'aptamères libres et d'aptamères liés à leur cible, on parle alors de bioessai en milieu homogène. Le changement en taille et en conformation dû à la formation du complexe aptamère/cible modifie les propriétés électrophorétiques de l'aptamère. De plus, les aptamères peuvent être facilement marqués par un fluorophore, ce qui permet une détection très sensible par le couplage de l'électrophorèse capillaire à un détecteur à fluorescence induite par laser (ou « laser-induced fluorescence (LIF) ».

Les aptamères présentent plusieurs avantages sur les anticorps pour leur utilisation en électrophorèse capillaire d'affinité. En effet, le ratio charge/masse uniforme des acides nucléiques rend leur mobilité électrophorétique prévisible. Un autre de leurs avantages est leur faible poids moléculaire, qui facilite la séparation du complexe aptamère/cible par rapport au ligand libre [229].

L'analyse de mélanges aptamère-cible pré-incubés est souvent choisie pour une analyse quantitative. Les deux méthodes utilisées, compétitive et non compétitive, sont basées sur la séparation des aptamères libres et des aptamères fixés par la cible. La figure 24 présente brièvement ces deux méthodes.

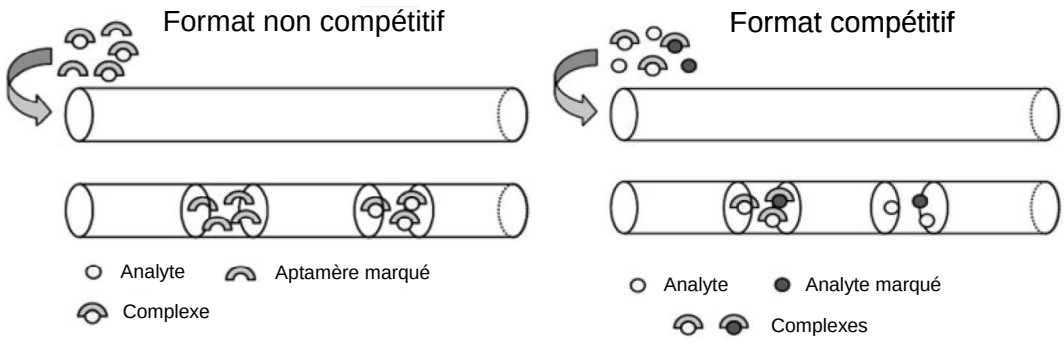


Figure 24 : Représentation schématique des méthodes d'analyse en format non compétitif et compétitif en électrophorèse capillaire. Adapté de [230]

Pour le format non compétitif, une quantité connue et en excès d'aptamères marqués est ajoutée à l'échantillon. La mesure et la comparaison des deux pics correspondants aux complexes aptamères/cible et aux aptamères libres permet la détermination de la concentration de l'analyte.

Concernant le format compétitif, une certaine quantité de molécule cible marquée est ajoutée à l'échantillon et entre en compétition avec la molécule cible initialement présente pour se lier aux aptamères ajoutés en quantité connue et limitée. La mesure et la comparaison des deux pics, correspondants aux molécules cibles marquées libres et aux molécules cibles marquées liées aux aptamères, permet la détermination de la concentration de molécule cible non marquée.

La première étude publiée utilisant les aptamères comme ligand en EC concerne la quantification de l'IgE par une méthode non compétitive [221]. Une limite de détection de 46 pM et une gamme linéaire de cinq ordres de grandeur ont été obtenus. La spécificité du bioessai a également été démontrée dans du sérum. Depuis, de nombreux autres travaux ont démontrés l'intérêt de cette méthode et ont été décrits dans plusieurs revues [230-233].

Les aptamères peuvent aussi remplacer les anticorps dans des bioessais en format « bandelette » (ou « *dipstick* »). Liu et son équipe ont adapté le principe de détection utilisé dans un capteur de cocaïne [220]. Des nanoparticules ont été fonctionnalisées par des oligonucléotides complémentaires des extrémités de la séquence de l'aptamère et par de la biotine. L'aptamère est ici utilisé comme oligonucléotide de liaison pour assembler les nanoparticules. En absence de cocaïne dans la solution dans laquelle la bandelette est immergée, les agrégats de nanoparticules, de taille trop importante, ne migrent pas. Si l'échantillon contient de la cocaïne, le changement de conformation de l'aptamère rompt son appariement avec l'oligonucléotide lié à la nanoparticule, provoquant ainsi la dispersion et la migration des nanoparticules le long de la bandelette. Une fine ligne de streptavidine permet la capture et la concentration de ces particules en une ligne rouge facilement

détectable à l'œil nu (figure 25). Ce bioessai en format bandelette a permis la détection de cocaïne à la concentration de 0,2 mM dans du sérum humain.

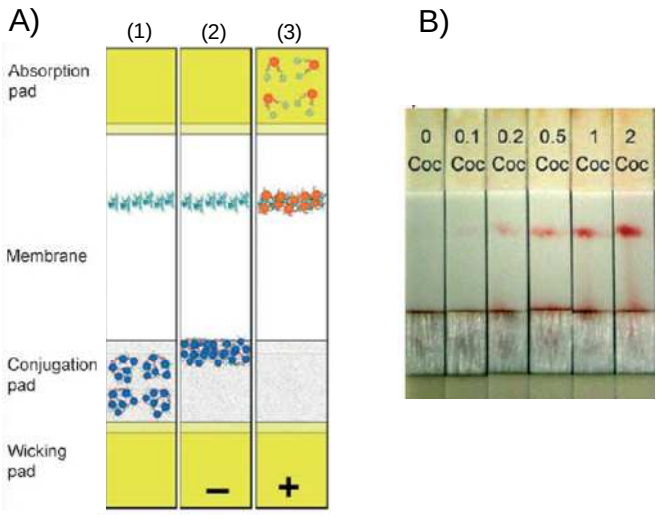


Figure 25 : Capteur de cocaïne en format « bandelette ». A) : Représentation schématique de la bandelette avant utilisation (1), après un test négatif (2) et après un test positif (3) (les agrégats de nanoparticules sont représentés en bleu et la ligne de streptavidine immobilisée en cyan). B) Détection de différente concentrations de cocaïne (mM) dans du sérum humain. Adapté de [220]

3. Les aptamères pour le diagnostic

Les aptamères sont également utilisés en cytométrie de flux, notamment pour la réalisation de diagnostics cliniques. Cette technique permet la détection d'aptamères fluorescents liés à leur cibles immobilisées à la surface d'une cellule ou d'une microparticule [195]. Des aptamères dirigés contre la L-sélectine marqués à la fluorescéine, ont permis le marquage de cellules sanguines humaines exprimant cette protéine [234]. Dans le même but, des aptamères marqués dirigés contre la protéine humaine CD4 ont été sélectionnés. La cytométrie de flux a permis leur détection à la surface de cellules exprimant cette protéine [235].

L'étude de la reconnaissance de biomarqueurs à la surface de cellules par des aptamères, détectables par cette technique, peut également être utilisée pour l'identification de cellules cancéreuses. Un SELEX effectué contre des lymphomes de cellules B a permis d'identifier des aptamères capables de reconnaître spécifiquement ces cellules cancéreuses dans un mélange de cellules de moelle osseuse humaine [236].

Des aptamères également dirigés contre des cellules cancéreuses ont été utilisés pour la conception d'un système de diagnostique miniaturisé [237]. Ces aptamères ont été immobilisés dans un microcanal dans lequel est percolé un

mélange de cellules saines et de cellules cancéreuses. Les cellules retenues sont détectées et comptées par microscopie à fluorescence. Plus de 80 % des cellules cancéreuses ont été retenues avec une pureté supérieure à 97%. Plus récemment, cette équipe a proposé un système miniaturisé pour l'enrichissement, le tri et la détection de plusieurs cellules cancéreuses [210]. Trois aptamères sélectionnés contre trois types de cellules cancéreuses, ont été immobilisés sur trois segments d'un microcanal. La percolation d'un mélange de ces trois types de cellules entraîne la capture de chaque type de cellule sur le segment correspondant. Des rendements d'extraction supérieurs à 50% avec des puretés supérieures à 88% ont été obtenus, démontrant ainsi le potentiel de ce type de dispositif pour le diagnostic précoce du cancer.

4. Les méthodes séparatives

a. La chromatographie d'affinité

Le principe de cette méthode est la séparation de composés contenus dans une phase mobile en fonction de leur affinité envers une phase stationnaire. Le format le plus populaire est la colonne d'immuno-affinité qui exploite la spécificité et l'affinité des anticorps. L'utilisation de phases stationnaires à base d'aptamères comporte quelques avantages [231]. En effet, l'immobilisation d'anticorps est très souvent non orientée contrairement aux aptamères qui peuvent être fixés par une extrémité de leur séquence fonctionnalisée à cet effet. La taille, environ dix fois plus faible pour les aptamères, pourrait permettre d'atteindre des densités de greffage plus importantes, donc de meilleures performances de séparation. Enfin, l'avantage principal concerne la flexibilité qu'offrent les aptamères concernant les conditions d'élution. En effet, celles-ci peuvent parfois être drastiques, nécessitant l'utilisation de forts pourcentages en solvant organique ou d'agents chaotropiques. Alors que les anticorps peuvent subir une dénaturation irréversible, les aptamères reprennent leur conformation active après dénaturation en l'espace de quelques minutes.

Un premier exemple concerne l'utilisation d'un aptamère sélectionné contre l'adénosine pour sa séparation d'avec ses dérivés tels que l'AMP, l'AMP cyclique, l'ATP, l'ADP et le NAD [238]. Le nombre de sites actifs obtenus est 3,3 fois plus important que celui obtenu classiquement lors de l'immobilisation d'anticorps sur le même type de support. Les analytes sont séparés en mode isocratique en fonction de leur constante de dissociation (figure 26 A). La séparation de ces composés lors de l'injection d'un extrait de tissu, a démontré la grande sélectivité apportée par les aptamères, mais aussi leur invulnérabilité aux effets de matrice.

Un autre exemple concerne l'utilisation d'une phase stationnaire monolithique fonctionnalisée par des aptamères [239]. Un copolymère de glycidyl méthacrylate et de trimethylolpropane trimetacrylate a été synthétisé in situ dans un capillaire de 100 µm de diamètre interne. Après sa modification par de la streptavidine, un aptamère biotinylé anti-cytochrome C a été immobilisé. Ayant une structure en tétrades de guanines, cet aptamère est également capable, mais dans une moindre mesure, de fixer la thrombine. Cette phase stationnaire a donc été utilisée pour la séparation du cytochrome C et de la thrombine d'autres protéines, comme la transferrine, l'albumine ou des IgG. La quantification du cytochrome C dans du sérum dopé a été réalisée (figure 26 B).

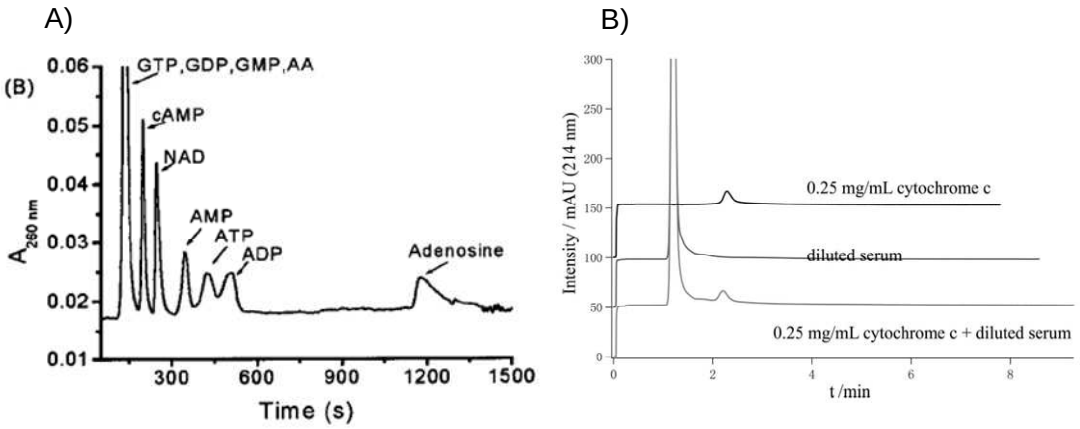


Figure 26 : Chromatogrammes résultants de séparations effectuées sur des phases stationnaires à base d'aptamères. (A) Séparation de l'adénosine et des analogues structuraux (AA : acide ascorbique) [238]. (B) Analyse d'un sérum humain dopé par le cytochrome C [239]

La faculté des aptamères à pouvoir différencier des énantiomères a été exploitée en chromatographie chirale. Des aptamères biotinylés sélectionnés contre la D-vasopressine ont été immobilisés sur un support de polystyrène-divinylbenzène activé streptavidine. Cette phase stationnaire à base d'aptamères a ensuite été utilisée pour la séparation chromatographique des énantiomères de la vasopressine [240]. Une grande sélectivité a été observée ; en effet, l'énantiomère D est retenu sur la colonne alors que l'énantiomère L est élué dans le volume mort. La sélectivité obtenue s'est avérée meilleure qu'avec l'utilisation de sélecteurs chiraux conventionnels, et comparable à celle obtenue en utilisant des anticorps monoclonaux.

Malgré leur dégradation très rapide par les enzymes dans les conditions habituelles d'utilisation et de stockage, des aptamères ARN peuvent également être utilisés pour la synthèse de phases stationnaires [231]. Les aptamères ARN en série L, résistants aux nucléases et appelés « Spiegelmers » (cf section Chap2.II.F),

possèdent les mêmes caractéristiques d'affinité et de spécificité que les aptamères naturels, tout en ayant une stabilité bien supérieure. Cette stratégie a été retenue afin de séparer les énantiomères de l'arginine [241], de la tyrosine et de ses dérivés [242] ou encore de l'histidine [243].

Dans la majorité des cas, l'immobilisation d'aptamères lors de la synthèse de phases stationnaires pour la chromatographie se fait par l'intermédiaire d'un lien biotine/streptavidine. Ce type d'immobilisation, très simple à réaliser, présente néanmoins un certain nombre de limitations pour une utilisation en chromatographie. Des conditions telles que des températures élevées ou de forts pourcentages en solvant organique peuvent dénaturer la streptavidine. Une phase stationnaire plus robuste basée sur l'immobilisation covalente par formation d'une liaison amide d'aptamères anti-adénosine a été décrite et utilisée pour la séparation des énantiomères de l'adénosine [244]. Le nombre de sites actifs obtenus, 3,4 nmoles pour 100 µL de phase stationnaire est très similaire à celui obtenu lors de l'immobilisation d'aptamères biotinylés sur des billes de polystyrène activées streptavidine [243], bien que le taux de greffage actif, correspondant au ratio entre le nombre d'aptamères immobilisés actifs sur le nombre total d'aptamères introduits pour immobilisation, soit relativement bas (6%). Le principal avantage de cette méthode d'immobilisation est la grande stabilité de la liaison formée. En effet, alors que le pourcentage de solvant organique dans la phase mobile est limité à quelques pourcents pour les phases stationnaires biotine/streptavidine, ce support a pu être utilisé en présence de phases mobiles telles que 100 % éthanol, eau/méthanol 50/50, eau pure, ou même en la chauffant pendant 6 heures à 60°C. Le passage d'environ 20 volumes de colonne de phase mobile tamponnée concentrée en magnésium permet la renaturation des aptamères pour la réutilisation de la colonne.

Des formats miniaturisés de chromatographie d'affinité à base d'aptamères anti-réplicase de l'hépatite C ont été développés [245,246]. Au sein d'un microsystème, ses aptamères ont été immobilisés sur des particules via une molécule de liaison photosensible et placés dans une chambre. Une irradiation UV a été choisie comme mode d'élution des complexes aptamères/réplicases. Avec ce dispositif, les auteurs ont été capables de détecter 96 fmol de réplicase de l'hépatite C dans un échantillon de 800 nL.

b. L'électrochromatographie

L'électrochromatographie combine les principes de la chromatographie à ceux de l'électrophorèse. Cette technique présente l'intérêt de pouvoir séparer des analytes fragiles dans des conditions non dénaturantes. Des aptamères sélectionnés

contre la flavine mononucléotide (FMN) ont été immobilisés pour la conception d'une phase stationnaire utilisée pour la séparation de la FMN et de la flavine adénine dinucléotide [247]. Cependant, la majorité des applications portant sur cette technique utilisent des phases stationnaires constituées d'aptamères non spécifiques des protéines séparées, mais formant des tétrades de guanine. En effet, la capacité de nombreuses protéines à se lier à des tétrades de guanine a été démontrée. La séparation par cette approche des variantes A et B de la β-Lactoglobuline [181], de plusieurs caséines et lactoglobulines [248], ou encore de d'albumines de différentes espèces [249] ont été décrites.

5. L'extraction sur phase solide

Dans ce chapitre, l'essor de l'utilisation d'aptamères dans des applications analytiques lors des dix dernières années a été démontré. Paradoxalement, très peu d'études portent sur l'utilisation d'aptamères pour l'extraction sur phase solide en tant que telle, de plus, la majorité d'entre elles ont été publiées après le début de cette thèse. D'ailleurs, de nombreux exemples cités dans ce paragraphe sont considérés par leurs auteurs comme relevant de la chromatographie d'affinité.

Les deux premiers exemples, exploitant tous deux des phases stationnaires à base d'aptamères, sont des méthodes hybrides entre l'extraction sur phase solide et la chromatographie d'affinité. En effet, la procédure fait penser à l'extraction sur phase solide car elle est composée des trois mêmes étapes : percolation, lavage et élution. Cependant, l'élution est réalisée par un gradient permettant d'obtenir un pic chromatographique pour quantifier l'analyte, ce qui est typique de la chromatographie d'affinité.

Le premier exemple, datant de 1999, décrit la purification chromatographique de la L-sélectine-globuline de milieu de culture conditionné de cellules ovariennes de hamster [250]. Le support d'immobilisation utilisé est la sépharose activée streptavidine sur laquelle sont fixés des aptamères biotinylés dans une colonne de dimension 0,5 x 5 cm. Après une étape de lavage par un tampon, les analytes, étant des protéines, sont élués dans des conditions non dénaturantes. Un gradient d'un agent chélatant, l'EDTA, déstabilise l'aptamère par chélation des cations divalents et permet l'élution de l'analyte (figure 27 A). Un rendement d'extraction de 83% a été obtenu.

Le deuxième exemple, paru en 2008, concerne l'utilisation d'une phase stationnaire monolithique fonctionnalisée par des aptamères [251]. Un copolymère de glycidyl méthacrylate et de trimethylolpropane trimetacrylate a été synthétisé in

situ dans un capillaire de 100 µm de diamètre inteme et sur une longueur de 8,5 cm. Un aptamère biotinylé anti-thrombine a été ensuite immobilisé après sa modification du capillaire par de la streptavidine. Après une étape de lavage par un tampon, la thrombine est éluée par une solution de $NaClO_4$ 2M (figure 27 B). L'injection d'autres protéines, conduisant à leur élution au temps mort, a permis de démontrer la sélectivité du support.

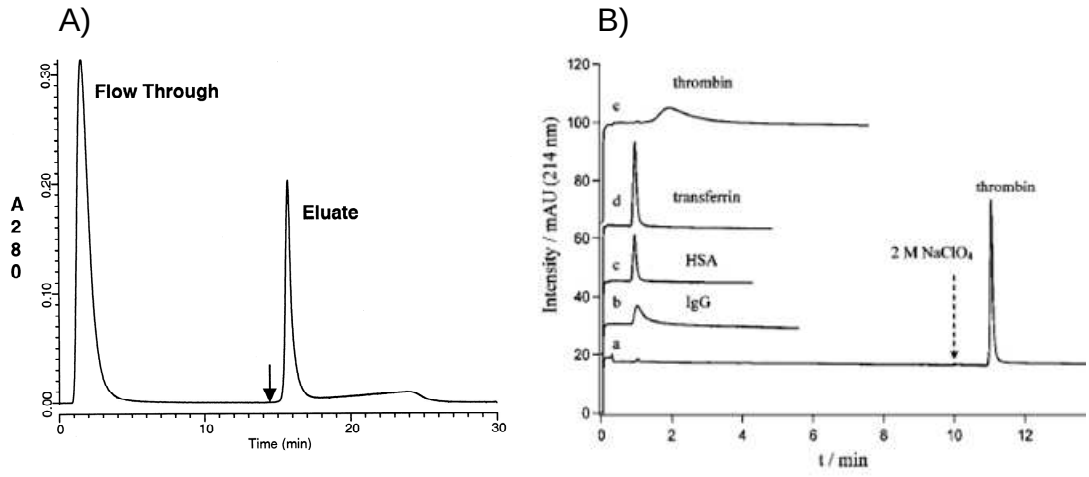


Figure 27 : (A) : Elution de la sélectine par un gradient d'EDTA après lavage par un tampon [250]. (B) : (a) Elution de thrombine par une solution de $NaClO_4$ après lavage par un tampon. (b-d) Injection de différentes protéines pour l'étude de la sélectivité. (e) Injection de la thrombine sur un support de contrôle sans aptamères pour évaluer les interactions non spécifiques [251]

L'utilisation de phases stationnaires à base d'aptamères pour la capture, la purification et l'analyse en spectrométrie de masse par désorption-ionisation laser assistée par matrice (ou « MALDI »), a été exposée pour la première fois en 2004 par Dick et McGown [249]. Un aptamère anti-thrombine a été immobilisé de manière covalente sur une surface de silice vierge. La thrombine présente dans l'échantillon de plasma est fixée lors de l'étape d'incubation, alors que les protéines non spécifiques, comme l'albumine, sont éliminées par un lavage. L'application de la matrice MALDI, par son pH acide, dénature les aptamères et entraîne la libération de la thrombine, constituant ainsi l'étape d'élution du protocole d'extraction et permettant ainsi son analyse. La sélectivité des aptamères a également permis l'analyse de la thrombine dans une matrice complexe telle que le plasma humain. D'autres travaux plus récents ont utilisé cette technique. L'analyse de l'immunoglobuline E a été réalisée avec une limite détection de l'ordre du picomolaire, l'injection de sérum humain ayant également été réalisée pour s'assurer de la sélectivité du support ([179], 2006). L'adénosine triphosphate a été analysée par désorption-ionisation laser assistée par surface (ou « SALDI ») à l'aide d'aptamères immobilisés sur des nanoparticules d'or ([252], 2007). La limite de

détection obtenue est égale à 0,48 µM et la sélectivité de la méthode a été évaluée dans un milieu de culture cellulaire. Cependant, pour toutes ces études, les rendements d'extractions ou les capacités des supports n'ont pas été évalués.

Un support à base d'aptamères a également été synthétisé pour l'extraction sélective sur phase solide de la thrombine ([253], 2006). Les aptamères anti-thrombine ont été immobilisés de manière covalente dans un capillaire de silice de 100 µm de diamètre interne. Après percolation de l'échantillon, incubation pendant une nuit et lavage par un tampon, la thrombine est éluée par une solution d'urée 8M à 50°C. Chaque fraction est collectée pour la quantification par spectroscopie de fluorescence et identification par spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Les interactions non spécifiques ont été évaluées par l'étude de la rétention sur un capillaire vierge et sur un capillaire greffé par un oligonucléotide, incapable de fixer la thrombine, car possédant la même séquence que l'aptamère mais dans un ordre aléatoire. La sélectivité de support a été démontrée par l'injection d'albumine qui n'est pas retenue sur le capillaire. Les rendements d'extraction sont cependant très faible, environ 11% pour le support à base d'aptamères contre environ 3,5% pour les supports de contrôle.

En 2007, Lin et ses collaborateurs ont décrit l'utilisation d'un aptamère anti-ATP en vue de l'extraction de l'AMP dans un système microfluidique [254]. Pour ce faire, les aptamères biotinylés (60 pmoles) sont immobilisés sur des billes de polystyrène fonctionnalisées par de la streptavidine et placées dans une chambre de 3,1 µL au sein du microsystème présenté en figure 28.

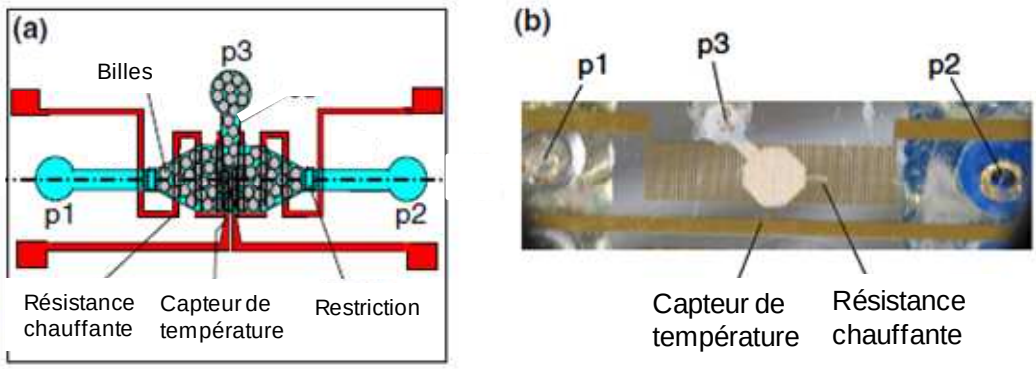


Figure 28 : Représentation schématique (a) et photographie (b) du microsystème. p1 et p2 représentent les réservoirs d'entrée et de sortie. p3 représente l'entrée pour la mise en place des billes dans la chambre. Adapté de [255]

Une solution d'AMP marquée par un fluorophore est injectée, et, après une étape de lavage par un tampon consistant à éliminer les composés retenus de manière non spécifique, une image de la fluorescence de la chambre est prise par un microscope à fluorescence inversé pour la détection des composés. L'élution peut

ensuite être réalisée par deux méthodes différentes. La première consiste à faire passer à travers le support une solution d'ATP. Ce composé possède une plus grande affinité envers les aptamères que l'AMP, et va donc provoquer le déplacement et l'élution de la molécule cible sans nuire à sa détection puisque l'ATP ne fluoresce pas. La deuxième méthode d'élution, plus efficace, consiste à chauffer le système à 80°C, ce qui provoque la dénaturation des aptamères et l'élution des composés. Cependant, cette température élevée peut également rompre la liaison biotine/streptavidine, empêchant la réutilisation du système. Une élution plus douce à 32,5°C a ensuite été adoptée, sans toutefois préciser la nature de la solution utilisée [256]. La spécificité des aptamères a été exploitée pour l'extraction sélective de l'AMP d'un mélange de plusieurs nucléosides triphosphates en milieu pur ([255], 2009). Une limite de détection de 100 pM a été obtenue.

Le microsystème a ensuite été couplé à un spectromètre de masse MALDI afin de détecter la vasopressine ([257], 2008). Comme le montre la figure 29, une vanne a été ajoutée pour permettre le dépôt de la fraction d'élution sur une plaque d'analyse MALDI. Un facteur d'enrichissement de 100 a été obtenu. La limite de détection du système n'est pas renseignée.

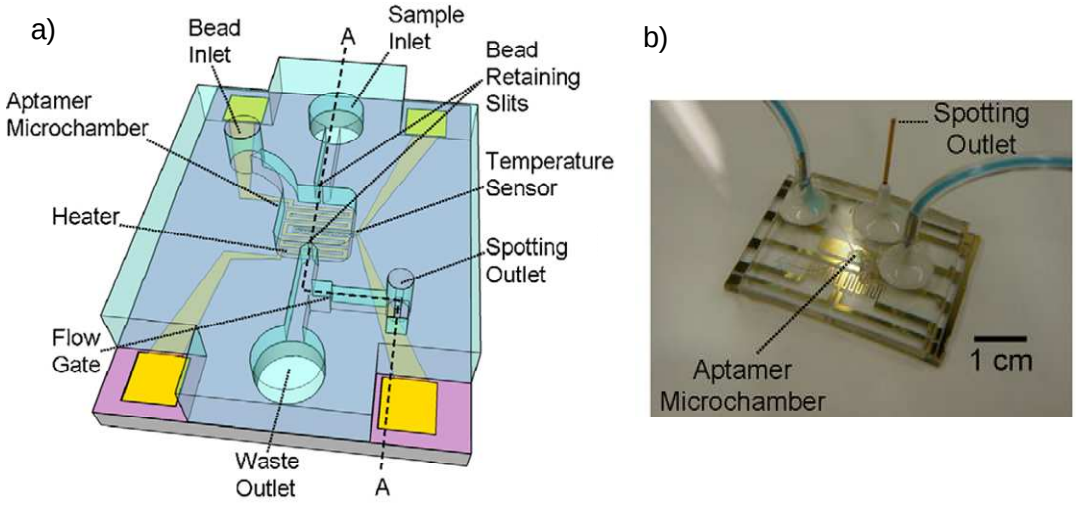


Figure 29 : Représentation schématique (a) et photographie (b) du microsystème. Adapté de [258]

Ce microsystème a également été appliqué à l'extraction et à l'analyse en MALDI-MS de la vasopressine à l'aide d'un aptamère « Spiegelmer » ([258,259], 2009). La préconcentration des analytes permet d'abaisser la limite de détection à environ 10 fM en milieu pur.

En 2008, Cruz-Aguado et Penner ont sélectionné et utilisé des aptamères anti-ochratoxine A à des fins d'extraction sélective sur phase solide [164]. La

constante de dissociation obtenue pour ces aptamères dans un tampon de fixation optimisé (10 mM Tris, pH=8,5, 120 mM NaCl, 5mM KCl, 20 mM $CaCl_2$) est de 50 nM (cf Chap3.VI.A). Les aptamères (8 nmoles) ont été immobilisés sur de l'agarose activée diaminodipropylamine (100 µL de gel). Le support a ensuite été placé dans une pointe de pipette et utilisé afin de quantifier l'OTA dans le blé. Les extraits de blé ont été dilués quatre fois par le tampon de fixation en vue d'abaisser le pourcentage de solvant organique (15% de méthanol après dilution). A titre de comparaison, pour les immunoadsorbants, une dilution des extraits d'un facteur dix est nécessaire si l'on veut minimiser les effets des solvants organiques. Après un lavage par 6 mL de tampon de fixation, l'OTA est éluée par une solution à 20% de méthanol contenant de l'EDTA pour chélater les cations divalents. Une détection fluorimétrique dans un lecteur de plaques permet ensuite la détermination de la concentration d'OTA dans la fraction d'élution. L'analyse de matrices certifiées par cette méthode a permis d'en démontrer la justesse.

Ces exemples de supports d'extraction à base d'aptamères semblent démontrer un très important apport en sélectivité, à tel point qu'aucune méthode de séparation chromatographique n'a été employée en amont de la détection des composés. Cependant, l'utilisation systématique de détecteurs spécifiques, comme la fluorescence ou la spectrométrie de masse, ne permet pas d'évaluer totalement la sélectivité apportée par le support ni l'efficacité de la purification. En outre, aucune étude détaillée du rendement de greffage des aptamères et de sa répétabilité, de la capacité du support, des interactions non spécifiques ou même du rendement d'extraction obtenu et de sa fidélité n'est rapportée. D'autre part, des échantillons plus complexes, telles que les fluides biologiques, peuvent être choisis dans le but d'étudier la sélectivité des supports.

Les objectifs de cette thèse sont la synthèse et la caractérisation complète de phases stationnaires à base d'aptamères, appelées oligoadsorbants, pour l'extraction sélective sur phase solide. Ces supports seront utilisés, en amont d'une analyse chromatographique, pour l'extraction de composés à l'état de traces dans des matrices complexes afin d'évaluer leur sélectivité. Une comparaison aux outils existants sera également effectuée.

Chapitre 3 – Synthèse et caractérisation d’oligoadsorbants

Chapitre 3 – Synthèse et caractérisation d'oligoadsorbants

Pour cette étude de faisabilité, deux aptamères sélectionnés contre des petites molécules ont été étudiés. L'aptamère anti-cocaïne a été choisi comme aptamère modèle pour le développement d'un oligoadsorbant, et l'aptamère anti-ochratoxine A a été utilisé pour s'assurer que les résultats obtenus avec l'aptamère anti-cocaïne étaient transposables à d'autres aptamères. Ces deux molécules cibles étant présentes dans des échantillons complexes (cf chap 1), une étape d'extraction sélective doit permettre une purification de l'échantillon et faciliter ainsi leur analyse. De plus, ces molécules sont compatibles avec l'utilisation de détecteurs simples et robustes tels que les détecteurs à absorbance UV ou les détecteurs à fluorescence durant la phase de caractérisation des supports synthétisés. L'utilisation de ce type de détecteurs, moins spécifiques que la spectrométrie de masse, permettra également de visualiser les interférences liées à la matrice et de vérifier l'apport en purification de l'étape de traitement de l'échantillon. Différentes méthodes d'immobilisation ont été expérimentées, et les oligoadsorbants obtenus ont été caractérisés afin de développer une procédure d'extraction optimisée.

I. Présentation des aptamères étudiés

A. L'aptamère anti-cocaïne

L'aptamère anti-cocaïne, composé de 38 désoxyribonucléotides, a été identifié par Stojanovic et ses collaborateurs [165] et utilisés dans de nombreux capteurs et bioessais (cf Chap 2). Son affinité a été évaluée comme étant inférieure à 5 µM dans son tampon de sélection constitué de 20 mM de TRIS (pH 7,4), 140 mM de NaCl, 5 mM de KCl et 1 mM de $MgCl_2$. Une structure secondaire a été proposée et est présentée en figure 30.

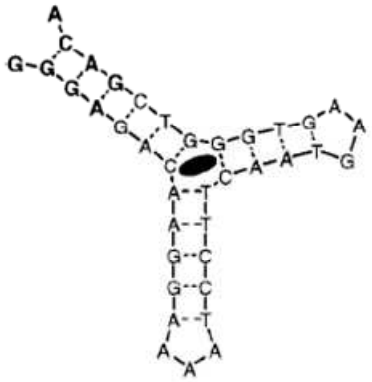


Figure 30 : Structure secondaire de l'aptamère anti-cocaïne lié à sa cible (ellipse noire). Adapté de [165]

Le site de reconnaissance de la cocaïne est localisé à la jonction de trois tiges. Ce motif structural et ses conséquences sur les caractéristiques de cet aptamère seront discutés dans le chapitre 4. La cavité hydrophobe formée est très riche en charges négatives, ce qui nécessite des tiges d'une longueur et d'une complémentarité suffisantes pour stabiliser la structure.

B. L'aptamère anti-ochratoxine A

L'aptamère anti-ochratoxine A est constitué de 36 désoxyribonucléotides et a été sélectionné en 2008 par Cruz-Aguado et Penner [164]. Ils n'étaient donc pas disponibles lorsque cette étude a été débutée. La constante de dissociation obtenue pour ces aptamères dans le tampon utilisé pour la sélection (10 mM HEPES, pH=7, 120 mM NaCl, 5mM KCl, 5mM $MgCl_2$) a été évaluée à 0,2 µM. Une étude de l'influence des cations divalents sur cette constante a permis d'abaisser sa valeur à 50 nM dans un autre tampon contenant notamment des ions calcium (tampon de fixation : 10 mM Tris, pH=8,5, 120 mM NaCl, 5mM KCl, 20 mM $CaCl_2$). Cet aptamère présente donc une meilleure affinité pour sa cible que l'aptamère anti-cocaïne. La figure 31 présente la séquence de l'aptamère anti-ochratoxine.

5'-GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGAGCATCGGACA-3'

Figure 31 : Séquence de l'aptamère anti-ochratoxine A.

Aucune structure secondaire n'a été suggérée par les auteurs, mais des doublets ou des triplets de guanines présents à plus de quatre reprises dans la séquence indiquent qu'une structure en tétrades de guanines est probable.

II. Supports d'immobilisation utilisés

La première étape pour la synthèse d'un adsorbant constitué de biomolécules immobilisées pour l'extraction sur phase solide est le choix du support de greffage. Puisque ces supports seront destinés à l'extraction de composés d'échantillons aqueux, ils doivent être relativement hydrophiles de sorte à limiter le risque de rétention non spécifique de composés interférents par interactions hydrophobes. La silice, la sépharose ou l'agarose sont fréquemment utilisées. L'adsorbant doit également présenter des groupements fonctionnels susceptibles de réagir avec un groupement de l'aptamère. Pour cela, les supports peuvent être activés par greffage d'un groupement réactif avant l'immobilisation de l'aptamère, mais des supports déjà activés pour l'immobilisation de biomolécules sont disponibles.

Bien que les aptamères puissent être immobilisés sans avoir été préalablement modifiés [164], la grande majorité des méthodes d'immobilisation décrites dans la littérature utilisent des aptamères à l'extrémité desquels un groupement réactif a été introduit au cours de sa synthèse. Trois modifications terminales sont disponibles commercialement : une amine, un thiol ou une biotine.

L'immobilisation d'aptamères biotinylés sur des supports activés par de la streptavidine ou de l'avidine, est de loin la méthode la plus utilisée [239,240,250,251,255,258]. Cette méthode de greffage est basée sur la très forte affinité que possède la biotine pour la streptavidine, la constante de dissociation de ces deux molécules libres en solution est de l'ordre de 4×10^{-14} M [260]. La streptavidine est une protéine tétramère, c'est-à-dire qu'elle possède quatre sites de fixation de la biotine. Ces propriétés permettent un protocole d'immobilisation très simple, consistant en l'incubation des aptamères avec l'adsorbant, et conduisent à l'obtention d'une liaison forte non covalente avec des rendements de fixation relativement élevés (environ 15 à 20 nmoles d'aptamères greffés sur 100 µL de support [261]). La spécificité du greffage par la biotine, située à l'extrémité de l'aptamère, entraîne un couplage orienté, ce qui permet de conserver les propriétés de fixation de ce dernier à sa cible.

L'utilisation de molécules de liaison ou « *crosslinkers* » , comme le sulfo-SIAB ou encore le SMCC, pour le greffage d'aptamères est également fréquente [181,262-265]. Ces molécules de liaison permettent de relier de manière covalente deux groupements fonctionnels à priori non réactifs l'un envers l'autre, tout en jouant le rôle de bras espaceur, donnant ainsi à l'aptamère la liberté conformationnelle et l'accessibilité nécessaires à la fixation de sa cible.

Les modifications thiol ou amine permettent également l'immobilisation covalente d'aptamères par des mécanismes de greffage empruntés à l'immobilisation de protéines par ces mêmes groupements. Deux supports, pour lesquels le laboratoire possède une certaine expérience concernant le greffage d'anticorps et d'enzymes [112,266-268], ont été choisis. Il s'agit de la silice activée glutaraldehyde et de la sepharose activée bromure de cyanogène. Pour ces deux supports, la réaction d'immobilisation nécessite des aptamères amino-modifiés.

Le groupement fonctionnel apporté par la modification est placé à l'extrémité d'un bras espaceur. Le bras espaceur remplit deux fonctions :

- présenter, lors de l'immobilisation, le groupement fonctionnel réactif au support activé avec une grande accessibilité, de manière à favoriser l'immobilisation par ce groupement
- éloigner l'aptamère, une fois immobilisé, de la surface du support afin d'augmenter sa liberté conformationnelle et l'accessibilité de la cible.

Quatre adsorbants activés ont été étudiés pour la synthèse d'un support d'extraction sélective sur phase solide à base d'aptamères anti-cocaïne :

- L'agarose activée streptavidine, pour le greffage d'aptamères biotinylés
- La sépharose activée thiol, pour le greffage d'aptamères amino-modifiés et via une molécule de liaison, le Sulfo-SIAB.
- La silice activée glutaraldehyde, pour le greffage d'aptamères amino-modifiés et selon un protocole adapté du greffage d'anticorps et enzymes
- La sepharose activée bromure de cyanogène, pour le greffage d'aptamères amino-modifiés et également selon un protocole adapté du greffage d'anticorps et enzymes

Les réactions correspondant à l'immobilisation d'aptamères sur ces quatre supports sont présentées en figure 32.

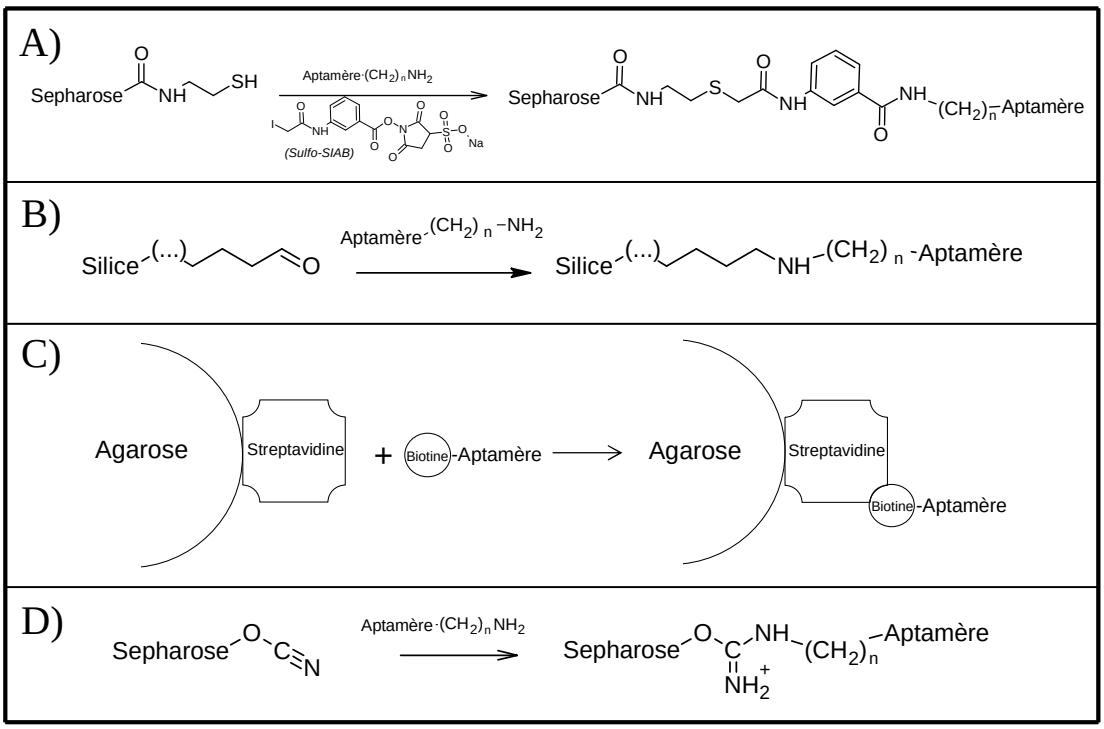


Figure 32 : Réactions de greffage des aptamères sur les supports étudiés. (A) : Immobilisation d'aptamères amino-modifiés sur un support de sepharose activée thiol via un crosslinker. (B) : Immobilisation d'aptamères amino-modifiés sur de la silice activée glutaraldehyde. (C) : Immobilisation d'aptamères biotinylés sur de l'agarose activée streptavidine. (D) : Immobilisation d'aptamères amino-modifiés sur de la sepharose CNBr.

III. Faisabilité de l'oligoextraction : caractérisation des oligoadsorbants anti-cocaïne synthétisés

Quatre types d'oligoadsorbants ont été synthétisés avec les supports décrits précédemment. Les procédures détaillées pour l'immobilisation des aptamères sur les différents supports testés sont présentées en annexe 1. Avant chaque greffage, les solutions d'aptamères à incuber sont chauffées à 80°C environ, puis ramenées lentement à température ambiante. Cette étape a pour but de dénaturer les aptamères, et de favoriser la formation des conformations actives par la diminution lente de la température.

Une fois synthétisés, la rétention de la cocaïne sur ces supports est étudiée et comparée à la rétention sur un support de contrôle, obtenu en suivant la même procédure de synthèse mais sans ajout d'aptamères. Ce support de contrôle permet d'évaluer les éventuelles interactions non spécifiques qui peuvent se développer avec le support. Une différence de rétention entre le support de contrôle et

l'oligoadsorbant sera synonyme d'interactions développées par les aptamères, et donc de la bonne immobilisation des oligonucléotides.

Le tampon de sélection est utilisé comme solution de conditionnement, percolation et de lavage car les aptamères ont montré une forte affinité envers leur cible dans cette solution lors du SELEX. Une température de 4°C pour ce tampon est choisie pour stabiliser au maximum le complexe entre l'aptamère et sa cible. Une étape de conditionnement du support constituée de 5 mL de tampon de sélection est effectuée avant chaque utilisation des supports. L'élution est réalisée avec une solution hydro-organique, qui provoque la dénaturation de l'aptamère et ainsi la libération de la cible. Chaque fraction est recueillie puis analysée par chromatographie liquide de partage à phases inversées, couplée à une détection par absorbance UV. Les conditions analytiques sont décrites en annexe 2.

A. Immobilisation sur de la sépharose activée thiol

La procédure d'immobilisation sur la sépharose activée thiol a été adaptée d'une étude réalisée par Allerson et ses collaborateurs sur la synthèse d'une phase stationnaire constituée d'ARN pour de la chromatographie d'affinité [262]. Les rendements de greffage obtenus sont compris entre 75 et 85% et ont été déterminés par l'analyse de surnageant de la solution d'immobilisation au début et à la fin du greffage. Des aptamères modifiés par un groupement amine en leur extrémité 5' sont tout d'abord fixés à la molécule de liaison sulfo-SIAB, par la formation d'une liaison amide entre l'amine de l'aptamère et le groupement ester de N-hydroxysuccinimide du sulfo-SIAB (cf figure 32 A). Après précipitation dans l'éthanol et redissolution dans un tampon phosphate, les aptamères ainsi modifiés sont ensuite fixés au support par substitution nucléophile entre l'iode du sulfo-SIAB et un groupement thiol du support activé, formant une liaison thioether.

Les aptamères (24 nmoles) ont été immobilisés sur l'équivalent de 35 mg de sepharose sèche activée, et le tout est placé entre deux frittés dans une cartouche SPE de 1 mL. Une procédure d'extraction composée de la percolation de 500 µL de tampon de sélection dopé par de la cocaïne à 200 ppb, d'un lavage par 500 µL de tampon de sélection et d'une élution par 500 µL d'un mélange eau/acétonitrile 60/40 (V/V) à 25°C a été appliquée sur l'oligoadsorbant ainsi que sur le support de contrôle. Le choix d'utiliser 40 % d'acétonitrile dans la fraction d'élution a été guidé par la composition de la phase mobile analytique, elle aussi constituée de 40 %

d'acétonitrile, permettant l'injection directe de cette fraction dans le système chromatographique. Le profil d'extraction obtenu est présenté en figure 33.

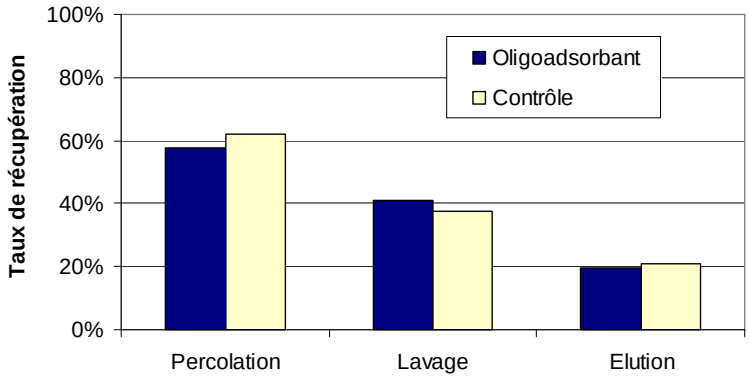


Figure 33 : Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant synthétisé avec la sépharose activée thiol. Percolation : 500 µL tampon de sélection dopé par de la cocaïne (T=4°C). Lavage : 500 µL de tampon de sélection (T=4°C). Elution : 500 µL d'un mélange eau/acétonitrile 60/40 (V/V) (T=25°C).

La rétention de la cocaïne sur l'oligoadsorbant est identique à celle observée sur le support de contrôle. Les interactions développées sur les deux supports sont donc analogues et de nature non spécifique. Cela signifie que l'immobilisation n'a pas abouti à la présence d'aptamères actifs à la surface du support. Les causes peuvent être multiples et provenir de chaque étape critique de la procédure d'immobilisation :

- du mauvais greffage de la molécule de liaison à cause de l'hydrolyse rapide de la fonction ester de N-hydroxysuccinimide
- des pertes d'aptamères lors de l'étape de précipitation dans l'éthanol
- de la désoxygénation insuffisante des solutions de couplage
- ou de l'immobilisation des aptamères par les amines présentes au niveau des bases azotées.

La recherche des causes et l'optimisation de cette procédure d'immobilisation seraient longues et fastidieuses étant donné le nombre d'étapes impliquées. Cette méthode d'immobilisation a donc été abandonnée au profit de procédures moins fastidieuses.

B. Immobilisation sur de la silice activée glutaraldehyde

Cette procédure d'immobilisation a été adaptée de procédures développées au laboratoire pour le greffage d'anticorps et d'enzymes via une fonction amine [267-269]. Des aptamères amino-modifiés sont immobilisés sur le support par une réaction d'amination réductrice, qui a lieu entre l'amine terminale de l'aptamère et l'aldéhyde du site actif de la silice activée. Les aptamères (8 nmoles) ont été greffés sur 35 mg de support, et l'oligoadsorbant obtenu est placé dans une cartouche SPE de 1 mL afin d'être caractérisé.

Un protocole d'extraction constitué d'une étape de percolation par du tampon de sélection dopé par de la cocaïne (100 µL, 200 ppb ; 4°C), d'un lavage par le tampon de sélection (100 µL, 4°C) et d'une élution par une solution eau/acétonitrile 60/40 (V/V, 100 µL, 25°C) a été appliqué sur l'oligoadsorbant et sur le support de contrôle. Les taux de récupération de cocaïne retrouvés dans chaque fraction sont présentés en figure 34.

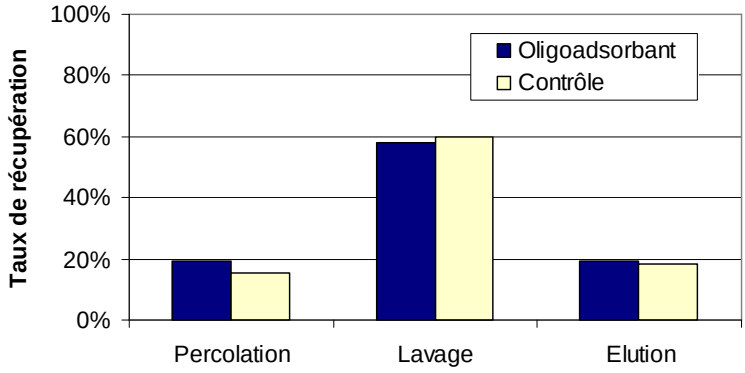


Figure 34 : Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant synthétisé avec la silice activée glutaraldehyde. Percolation : 100 µL tampon de sélection dopé par de la cocaïne (T=4°C). Lavage : 100 µL de tampon de sélection (T=4°C). Elution : 100 µL d'un mélange eau/acétonitrile 60/40 (V/V). (T=25°C).

Ici encore, aucune différence de rétention significative n'est observée entre les deux supports. Cette procédure d'immobilisation n'a donc pas permis l'obtention d'aptamères actifs à la surface du support.

Une des causes pouvant expliquer cette mauvaise immobilisation est le greffage éventuel des aptamères par les amines des bases azotées plutôt que l'amine terminale de la modification, ce qui figerait l'aptamère et l'empêcherait d'adopter sa conformation active. Pour tenter de limiter ce phénomène, un greffage a été effectué en présence de cocaïne en excès, de sorte à favoriser la structure à trois tiges boucles du complexe, rendant ainsi moins accessibles les amines des bases azotées. Des

résultats similaires ont été obtenus en appliquant ces conditions de greffage, infirmant l'hypothèse d'une immobilisation par les amines des bases azotées.

L'échec de cette immobilisation peut être dû à la présence d'un revêtement polymère hydrophile à la surface des billes de silice [270]. Ce polymère de polyethylèneimine est chargé positivement au pH de la solution de couplage (pH=6). Étant de nature polyanionique, les aptamères se sont probablement fortement liés à ce polymère par des interactions électrostatiques les rendant inactifs pour la fixation de la cocaïne.

Ainsi, si ce support convient à l'immobilisation de biomolécules dont l'état de charge est proche de zéro, comme les anticorps ou les enzymes, il ne convient pas aux oligonucléotides car leur état de charge est très négatif. Ce support a donc été écarté pour cette étude.

C. Immobilisation sur de l'agarose activée streptavidine

Pour la synthèse de ce support, des aptamères biotinylés (9 nmoles) sont incubés une nuit avec le support (300 µL de la solution de billes d'agarose activée en suspension). La procédure de greffage a été adaptée d'une note d'application d'un fournisseur de ce type de support [271]. L'oligoadsorbant obtenu est appelé $COC_{Strepta}$ n°1.

1. Développement de la procédure d'extraction : choix des conditions d'élution

La liaison biotine/streptavidine formée entre l'aptamère et le support, bien qu'étant très forte ($K_D \sim 4 \times 10^{-14}$ [260]), est de nature non covalente. Les conditions d'élution ne doivent donc pas dénaturer la streptavidine au risque de rompre cette liaison et donc de dégrader le support. Les solutions riches en solvant organique généralement utilisées doivent être évitées.

Une solution d'eau pure à 60°C a été choisie dans un premier temps. La très faible force ionique, l'absence de cations divalents et la température élevée de cette solution sont des paramètres favorables pour dénaturer l'aptamère et donc éluer la cocaïne [255,272]. Un protocole d'extraction constitué de la percolation du tampon de sélection dopé par de la cocaïne (500 µL, 200 ppb, 4°C), d'un lavage par le tampon de sélection (500 µL, 4°C), et de plusieurs fractions d'élution (500 µL)

d'eau pure à 60°C jusqu'à obtenir la totalité de la cocaïne percolée est appliqué. Le profil d'extraction correspondant est présenté en figure 35.

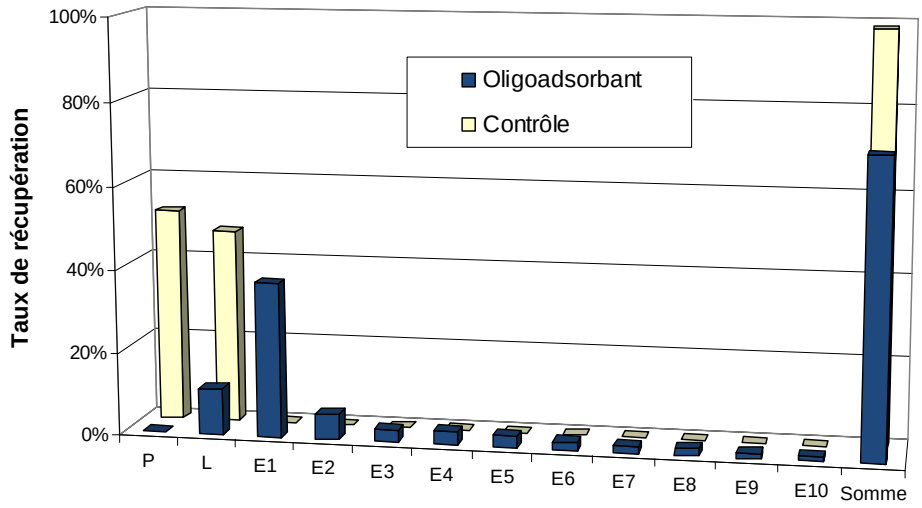


Figure 35 : Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant $COC_{Strepta}$ n°1 synthétisé à partir d'agarose activée streptavidine. P (Percolation) : 500 µL tampon de sélection dopé par de la cocaïne (T=4°C). L (Lavage) : 500 µL de tampon de sélection (T=4°C). E (Elution) : 500 µL d'eau pure à 60°C

Une forte différence de rétention est observée entre les deux supports. En effet, la totalité de la cocaïne est éluée après l'étape de lavage sur le support de contrôle alors que seulement 11% de cocaïne sont élués sur l'oligoadsorbant. Ce résultat prouve donc la bonne immobilisation d'aptamères toujours actifs à la surface du support. De plus, aucune trace de cocaïne n'est retrouvée dans la fraction de percolation après passage sur l'oligoadsorbant, ceci indique que le volume de fin de fixation est supérieur à 500 µL.

Cependant, la force éluante de l'eau pure à 60°C n'est pas suffisante puisque environ 30% de la cocaïne percolée est toujours fixée sur le support après la percolation de 5 mL de cette solution. Une solution plus dénaturante doit être employée, mais toujours en prenant garde à ne pas endommager la liaison biotine/streptavidine. Un mélange eau/acétonitrile 90/10 (V/V) à 60°C a été testé. Le profil correspondant, rapportant les moyennes et écarts types obtenus pour trois répétitions, est présenté en figure 36.

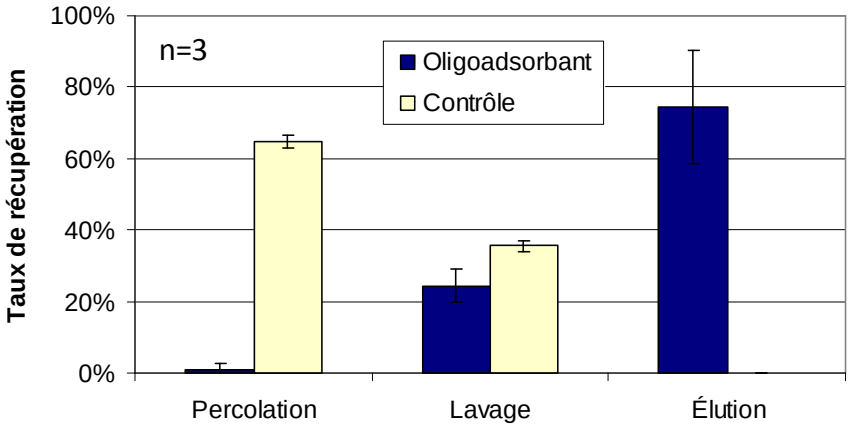


Figure 36 : Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant $COC_{Strepta}$ n°1 synthétisé à partir d'agarose activée streptavidine. Percolation : 500 µL tampon de sélection dopé par de la cocaïne (T=4°C). Lavage : 500 µL de tampon de sélection (T=4°C). Elution : 1000 µL d'un mélange eau/acétonitrile 90/10 (V/V) à 60°C. Moyennes et écarts types sur 3 répétitions.

Avec cette solution d'élution, 1 mL suffit pour éluer la totalité de la cocaïne retenue sur le support. La concentration en cocaïne dans la fraction obtenue est donc maximale. Un rendement d'extraction de 74 % est obtenu sur l'oligoadsorbant, avec une répétabilité satisfaisante puisqu'un écart type de 16 % est obtenu pour trois répétitions.

L'élution étant basée sur la dénaturation des aptamères, leur durée de renaturation a été estimée afin de connaître le temps nécessaire entre deux extractions. Deux protocoles d'extraction identiques ont été réalisés successivement, uniquement séparés par l'étape de conditionnement de la deuxième extraction, qui est constituée de 5 mL de tampon de sélection. Les profils obtenus étant similaires, l'étape de conditionnement intermédiaire entre deux extractions est donc suffisante pour renaturer les aptamères, permettant ainsi la réutilisation instantanée de la cartouche d'extraction. Cette caractéristique des oligoadsorbants contraste fortement avec la durée de renaturation des immunoadsorbants, pour lesquels un reconditionnement de 24 à 48 h est nécessaire entre deux extractions [112].

2. Étude de stabilité

Le risque lié à l'utilisation de cette solution d'élution plus dénaturante est la dégradation de la phase stationnaire dont la conséquence serait une diminution de la rétention au fil des utilisations du support. La stabilité dans le temps de la liaison biotine/streptavidine doit donc être de nouveau évaluée. Après une période de neuf mois, pendant laquelle l'oligoadsorbant $COC_{Strepta}$ n°1 a été utilisé une dizaine de fois, la rétention de la cocaïne sur l'oligoadsorbant a été étudiée. La procédure

d'extraction développée précédemment a été répétée trois fois. Les résultats obtenus sont présentés en figure 37.

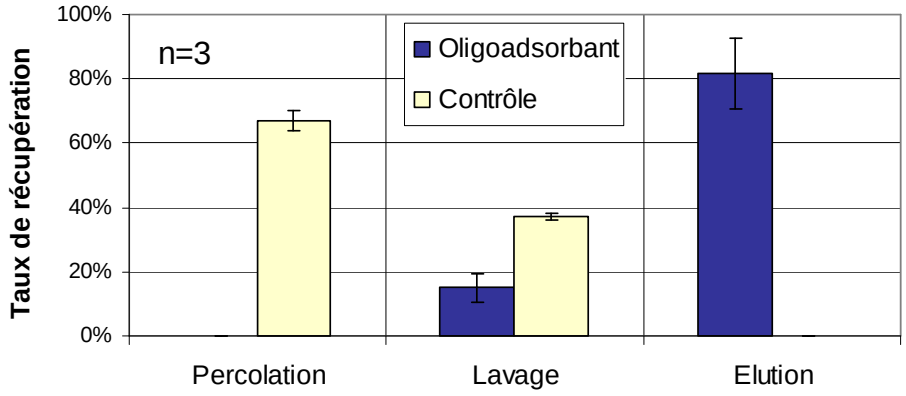


Figure 37 : Profil d'extraction obtenu neuf mois après la synthèse. Procédure identique à celle de la figure 36.

Le rendement d'extraction obtenu est de 82 ± 11 %, à comparer aux 74 ± 16 % obtenus précédemment. Aucune perte en rétention n'a donc été observée, ce qui démontre que la solution d'élution choisie ne fragilise pas la liaison biotine streptavidine. D'autre part, l'ADN semble être suffisamment stable pour permettre un stockage prolongé sans nuire aux performances de l'oligoadsorbant.

3. Capacité du support

La capacité de la cartouche d'extraction, correspondant à la quantité maximale de cocaïne percolée retenue par interactions spécifiques a été mesurée. Pour ce faire, des extractions, sont effectuées sur l'oligoadsorbant $COC_{Strepta}$ n°1 en augmentant progressivement la quantité de cocaïne contenue dans la fraction de percolation (de volume constant) et en suivant la procédure précédemment développée. La quantité de cocaïne retenue, correspondant à la quantité retrouvée dans la fraction d'élution, est reportée en fonction de la quantité percolée sur l'oligoadsorbant. Les courbes de capacité ainsi obtenues pour l'oligoadsorbant et le support de contrôle sont présentées en figure 38.

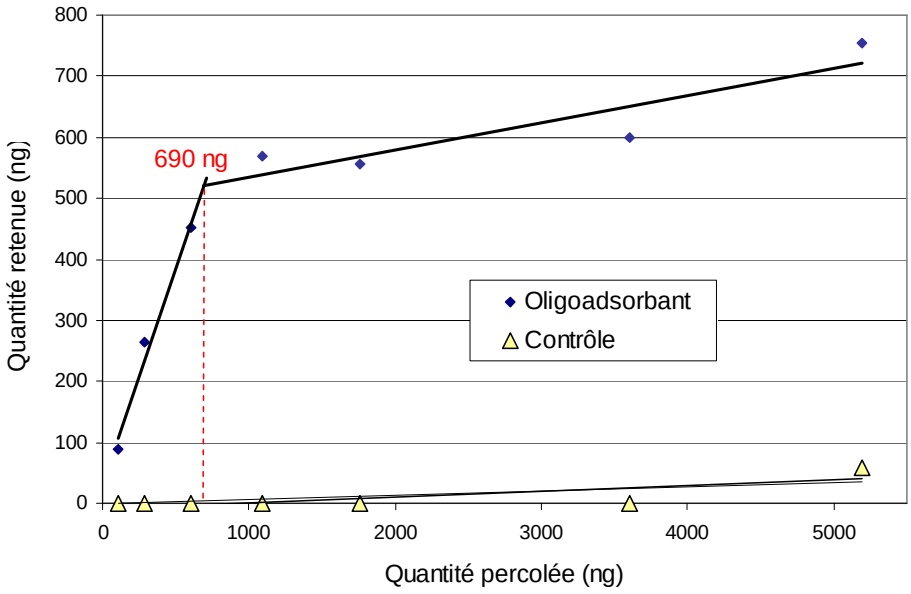


Figure 38 : Courbes de capacité de l'oligoadsorbant $COC_{Strepta}$ n°1 et de son support de contrôle synthétisés à partir d'agarose activée streptavidine. Procédure identique à celle de la figure 36.

La courbe correspondant au support de contrôle est linéaire et traduit l'augmentation de la quantité de cocaïne retenue de manière non spécifique proportionnellement à la quantité percolée. La courbe correspondant à l'oligoadsorbant est quant à elle constituée de deux parties linéaires. Dans un premier temps, la quantité retenue augmente proportionnellement à la quantité percolée, synonyme d'un rendement d'extraction constant (estimé à 71 % par la pente de la droite). La courbe atteint ensuite un plateau témoignant de la saturation du support. Les aptamères ne sont pas assez nombreux pour retenir la totalité de la cocaïne percolée, ce qui entraîne une élution prématurée de la cocaïne, et donc une diminution du rendement d'extraction. La capacité du support est atteinte et sa valeur correspond à l'abscisse de l'intersection des deux parties linéaires de la courbe. Une valeur de 690 ng de cocaïne pour un volume de gel estimé à 170 µL a été obtenue sur cet oligoadsorbant. Ceci correspond à une quantité d'aptamères actifs greffés de 1,33 nmoles pour 100 µL d'oligoadsorbant.

Les quantités totales d'aptamères fixés rapportées concernant cette méthode d'immobilisation sont généralement de l'ordre de 20 nmoles pour 100 µL de support [240-243,273]. Cependant, elles sont généralement déduites de la mesure par absorbance UV de la concentration résiduelle en aptamère à la fin du greffage, et très souvent, ne tiennent pas compte des aptamères seulement adsorbés, éliminés lors du premier lavage du support. Elles reflètent donc la quantité totale d'aptamères immobilisés et ne sont pas comparables avec les valeurs de capacité qui ne comptabilisent que les aptamères actifs. La quantité d'aptamères actifs greffés n'est évaluée que dans très peu d'études. Un support pour chromatographie d'affinité basé

sur cette méthode d'immobilisation a montré une quantité d'aptamères anti-histidine actifs greffée de 3,3 nmoles pour 100 µL de gel [243], valeur très proche de celle obtenue pour l'oligoadsorbant $COC_{Strepta}$ n°1. Deng et ses collaborateurs ont obtenu une valeur plus élevée avec un aptamère anti-adénosine, de l'ordre de 20 nmoles / 100 µL de support, déterminée par chromatographie frontale [238], ce qui nous laisse penser qu'une optimisation des conditions de greffage, telles que la concentration en aptamères, la quantité de phase, le temps de greffage et la température permettrait d'atteindre une meilleure capacité. La valeur obtenue est néanmoins amplement suffisante pour l'extraction de cocaïne de matrices biologiques dans lesquelles elle se trouve très souvent à l'état de traces.

En se basant sur l'hypothèse qu'une molécule de cocaïne se fixe à un aptamère, la quantité d'aptamères actifs immobilisés à la surface du support peut être estimée. Le rendement de greffage efficace, correspondant au rapport du nombre d'aptamères immobilisés et actifs sur le nombre d'aptamères introduits pour le greffage est évalué à 25,1 %. Il est néanmoins important de souligner que ce pourcentage est sous-estimé en raison de la pureté des aptamères utilisés pour la synthèse. En effet, le fournisseur indique que la pureté de la séquence demandée est comprise entre 80 et 85 %, 15 à 20 % des séquences sont donc incapables de reconnaître la cocaïne.

4. Répétabilité de la synthèse

Un second oligoadsorbant, appelé $COC_{Strepta}$ n°2, basé sur cette méthode d'immobilisation a été synthétisé afin d'évaluer la répétabilité de la synthèse. Le protocole d'extraction précédemment développé a été appliqué et le profil obtenu est présenté en figure 39.

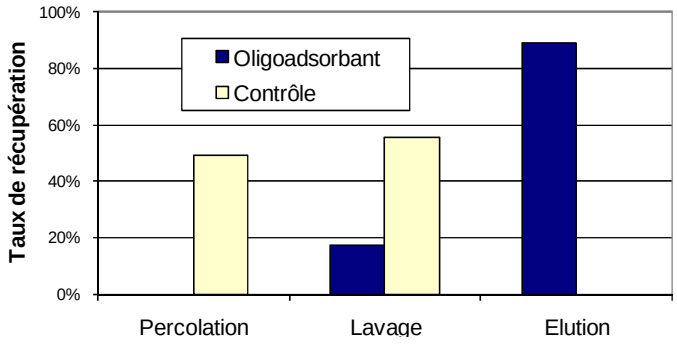


Figure 39 : Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant $COC_{Strepta}$ n°2 synthétisé à partir d'agarose activée streptavidine. Procédure identique à celle de la figure 36

Le profil obtenu est très similaire à celui obtenu lors de la première synthèse. Le rendement d'extraction est de 89 %, valeur proche de ceux observés avec la

première cartouche ($COC_{Strepta}$ n°1), ce qui est un résultat encourageant quant à la répétabilité de la synthèse de cet oligoadsorbant. Une synthèse supplémentaire permettrait de s'en assurer totalement.

5. Conclusion

Cette méthode d'immobilisation des aptamères, très simple à mettre en œuvre, s'avère très intéressante pour la conception d'oligoadsorbants. Une forte rétention spécifique ainsi qu'une capacité satisfaisante ont été observées.

Néanmoins, cette immobilisation non covalente engendre quelques limitations concernant le choix de la solution d'élution. Comme évoqué précédemment, l'élution doit être réalisée sans dénaturer la streptavidine, ce qui interdit l'utilisation des solutions à haute force éluante telles que des solutions riches en solvant organique. Le volume de la fraction d'élution ne peut donc pas être réduit au minimum, ce qui limite le facteur d'enrichissement.

C'est pourquoi, il parait intéressant de développer des oligoadsorbants plus robustes, basés sur une immobilisation covalente.

D. Immobilisation sur de la sepharose activée bromure de cyanogène

La procédure suivie pour ce support a été adaptée de procédures développées au laboratoire pour l'immobilisation d'anticorps et d'enzymes [266-268]. Des aptamères amino-modifiés sont immobilisés par la réaction de leur amine terminale sur les sites actifs de la sépharose activée (esters de cyanates ou imidocarbonates). 35 mg de sépharose sèche ont été utilisés pour le greffage, et le tout est placé dans une cartouche SPE de 1 mL. L'oligoadsorbant obtenu est appelé COC_{CNBr} n°1.

1. Evaluation de la rétention spécifique

Un premier protocole d'extraction dont les volumes des différentes fractions ont été arbitrairement fixés à 500 µL a été appliqué. Après la percolation du tampon de sélection dopé par de la cocaïne à 200 ppb et un lavage par le tampon de sélection, l'élution est réalisée par la percolation d'une solution eau/acétonitrile 60/40 (V/V). Le profil d'extraction obtenu est présenté en figure 40.

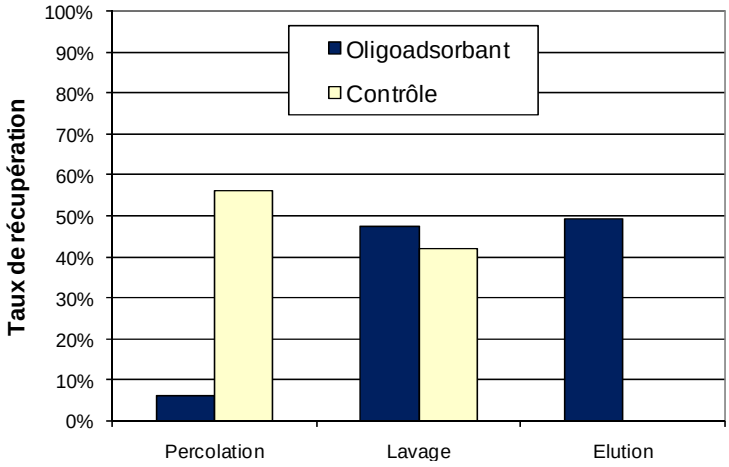


Figure 40 : Profil d'extraction obtenu sur le support synthétisé avec la sépharose activée CNBr. Percolation : tampon de sélection dopé par de la cocaïne (T=4°C). Lavage : tampon de sélection (T=4°C). Elution : mélange eau/acétonitrile 60/40 (V/V). (T=25°C). Fractions de 500 µL

Ce profil met en évidence une différence de rétention entre l'oligoadsorbant et le support de contrôle. En effet, après l'étape de lavage, la totalité de la cocaïne percolée est éliminée du support de contrôle alors que 49 % sont toujours fixés sur l'oligoadsorbant. Ce résultat révèle donc la présence d'interactions spécifiques développées par les aptamères, traduisant une immobilisation réussie.

Cependant, le rendement d'extraction obtenu n'est que de 49 %. Etant donné que les volumes des différentes fractions sont identiques à ceux de la procédure développée sur le support $COC_{Strepta}$ n°1, on peut en conclure que la rétention sur cet oligoadsorbant est inférieure. La perte anticipée de la cocaïne dans les fractions de percolation et de lavage est probablement due à un dépassement du volume de fin de fixation. Celui-ci doit donc être estimé afin d'optimiser le protocole d'extraction, dans le but d'améliorer le rendement d'extraction.

2. Etude du volume de fin de fixation et développement de la procédure d'extraction

Pour la détermination du volume de fin de fixation de la cocaïne lorsqu'elle est percolée dans le tampon de sélection, la percolation de 200 µL de ce tampon dopé par de la cocaïne (150 ppb) a été suivie de plusieurs fractions de lavage par le tampon de sélection jusqu'à l'élution totale de la cocaïne. Les taux de récupération obtenus pour ces différentes fractions sur l'oligoadsorbant ainsi que sur le support de contrôle sont présentés en figure 41.

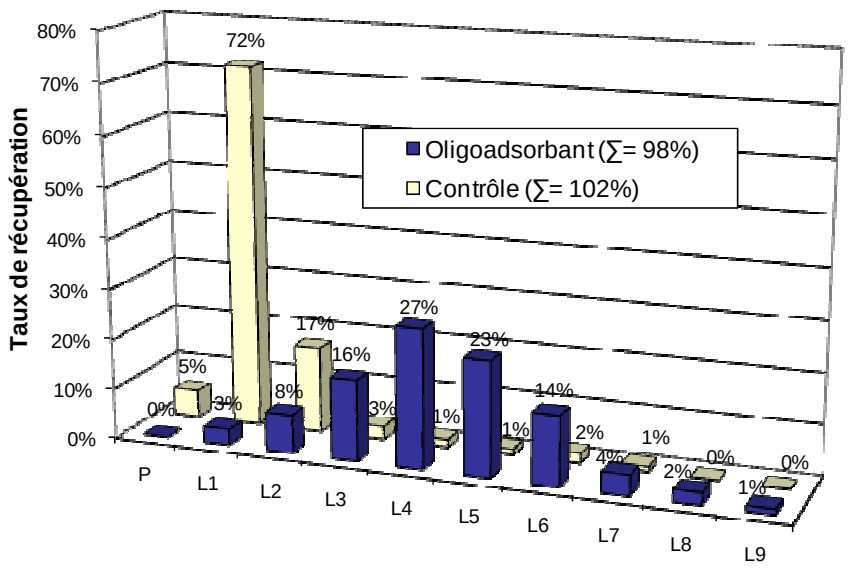


Figure 41 : Comparaison de la rétention de la cocaïne sur l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 et sur le support de contrôle lors du passage de tampon de sélection. P : percolation de 200 µL de tampon de sélection dopé par de la cocaïne (T=4°C). Lavages avec le tampon de sélection : 200 µL pour L1 et 100 µL pour L2-L9 (T=4°C).

Ces profils d'élution permettent une nouvelle fois de souligner la différence de rétention entre l'oligoadsorbant et le support de contrôle. Après le lavage L2, correspondant à une percolation de 200 µL suivi d'un lavage de 300 µL, la quasi-totalité de la cocaïne percolée est éluée du support de contrôle, alors que près de 90 % sont toujours fixés sur l'oligoadsorbant. Le volume de fin de fixation sur l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 est donc compris entre 200 µL et 500 µL.

Ces résultats indiquent aussi qu'une fraction de lavage de 300 µL, après une étape de percolation de 200 µL, permettrait de rompre la plupart des interactions non spécifiques développées par le support sans affecter la rétention de la cocaïne par les aptamères. Ces deux volumes sont donc choisis pour la procédure d'extraction sélective.

Concernant l'élution, le volume minimal permettant l'élution totale de la cocaïne a été étudié. Plusieurs fractions de 200 µL d'un mélange eau/acétonitrile 60/40 (V/V) ont été percolées sur le support jusqu'à l'élution de la totalité de la cocaïne percolée. Deux fractions de 200 µL ont suffi pour éluer la totalité de la cocaïne. Une fraction élution de 400 µL d'un mélange eau/acétonitrile 60/40 (V/V) a donc été choisie.

Le profil d'extraction moyen obtenu pour trois répétitions de cette procédure est présenté en figure 42.

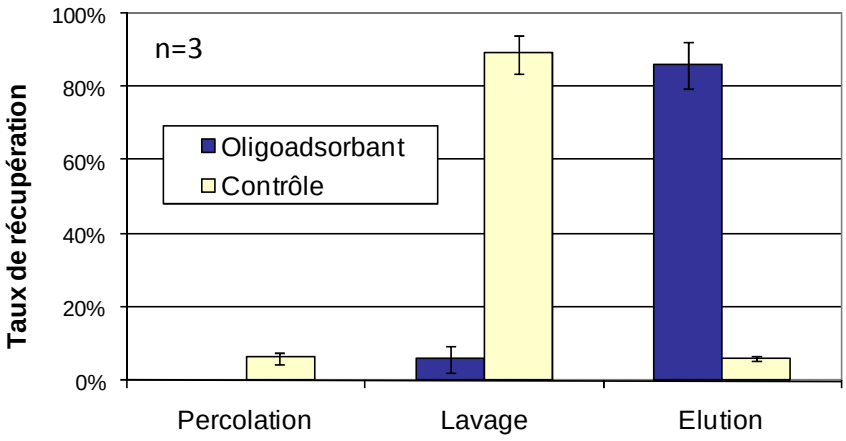


Figure 42 : Profil d'extraction optimisé pour l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 synthétisé à partir de sepharose CNBr. Percolation : 200 µL de tampon de sélection dopé par de la cocaïne (300 ppb, T=4°C). Lavage : 300 µL tampon de sélection (T=4°C). Elution : 400 µL d'un mélange eau/acétonitrile 60/40 (V/V). (T=25°C)

Le rendement d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 est de 86 ± 10 % (n=3), alors que seulement 6 % de la cocaïne percolée se retrouvent dans la fraction d'élution du support de contrôle. Ici encore, 5 mL de tampon de sélection suffisent pour le reconditionnement de la cartouche entre deux extractions.

Pour s'assurer que la rétention apportée par les aptamères est bien de nature spécifique, par la présence d'un site de reconnaissance, un oligonucléotide amino-modifié, composé des mêmes nucléotides que l'aptamère anti-cocaïne mais placés dans un ordre aléatoire, a été immobilisé sur la sépharose activée CNBr en suivant la même procédure. Puisque la séquence de l'aptamère a été mélangée, cet oligonucléotide ne possède pas de site de reconnaissance de la cocaïne. L'étude de la rétention de la cocaïne par ce support permet donc de s'assurer que la rétention observée sur l'oligoadsorbant n'est pas due à des interactions non spécifiques développées entre la cocaïne et un brin d'ADN. La figure 43 présente le profil d'extraction obtenu sur ce support avec séquence mélangée et le compare à ceux obtenus précédemment avec l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 et le support de contrôle.

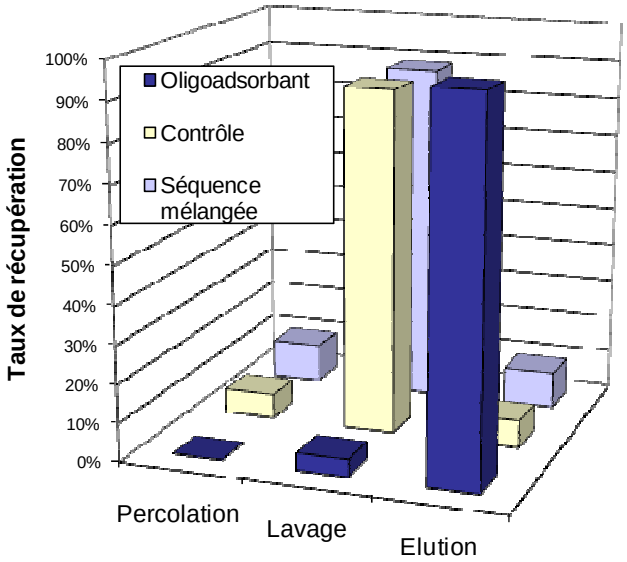


Figure 43 : Comparaison des profils d'extractions obtenus sur l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1, le support de contrôle et le support avec l'aptamère dont la séquence a été mélangée. Procédure identique à celle de la figure 42.

La rétention observée sur ce support dit « mélangé » est identique à celle observée sur le support de contrôle, sur lequel aucun oligonucléotide n'est greffé. Cela signifie qu'aucune interaction non spécifique supplémentaire n'est apportée par la présence d'un acide nucléique immobilisé sur le support. Les interactions développées pour la rétention de la cocaïne sur l'oligoadsorbant sont donc bien de nature spécifique, et liées à la présence du site de reconnaissance dans la conformation active de l'aptamère.

La rétention de la cocaïne a également été évaluée par un oligoadsorbant pour lequel l'aptamère greffé différait d'un nucléotide par rapport à la séquence décrite. En effet, une cytosine ($5^{ème}$ nucléotide en partant de l'extrémité 3') a été remplacée par une guanine (suite à une erreur du fournisseur). Le protocole d'extraction précédemment développé a été appliqué sur ce support. Le profil d'extraction obtenu est comparé à ceux obtenus sur l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 et sur le support de contrôle en figure 44.

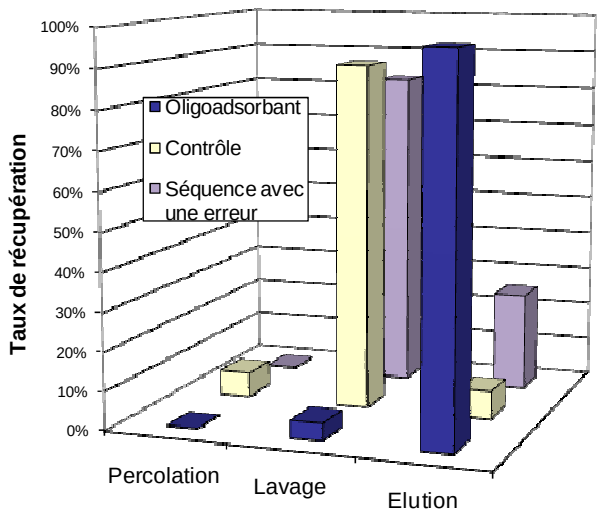


Figure 44 : Comparaison des profils d'extractions obtenus sur l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1, le support de contrôle et le support greffé par l'aptamère dont la séquence possède une erreur. Procédure identique à celle de la figure 42.

La figure 44 montre que le changement d'un seul nucléotide dans la séquence de l'aptamère modifie totalement son comportement. En effet, la rétention sur ce support est très similaire à celle du support de contrôle, sur lequel aucun oligonucléotide n'est immobilisé. L'affinité de l'aptamère est donc presque rendue nulle par ce simple changement d'un nucléotide dans la séquence. Ce résultat souligne la puissance du procédé SELEX, capable d'isoler la séquence possédant l'affinité attendue parmi de très nombreuses séquences très proches, mais inaptes pour la fixation de la cible.

3. Capacité du support

La capacité de l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1, directement liée au nombre d'aptamères actifs liés au support, a ensuite été déterminée. La courbe de capacité, obtenue de la même manière que pour l'oligoadsorbant $COC_{Strepta}$ n°1, est présentée en figure 45.

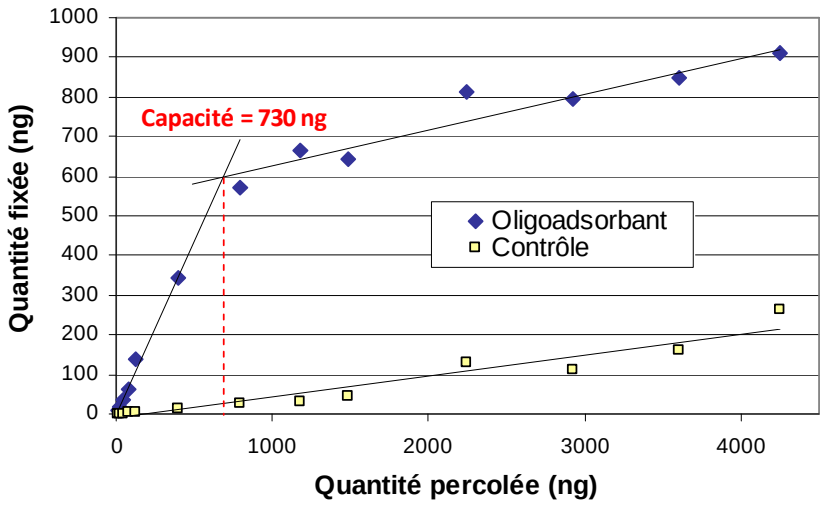


Figure 45 : Courbe de capacité de l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 et de son support de contrôle synthétisés à partir de sepharose activée CNBr.

La valeur de la capacité, correspondant à l'abscisse de l'intersection des deux parties linéaires de la courbe, est estimée à 730 ng. L'utilisation d'une solution d'immobilisation contenant 150 µg d'aptamères, équivalents à 12,5 nmoles, a donc permis la rétention spécifique de 730 ng de cocaïne, équivalents à 2,4 nmoles. Étant donné qu'une molécule de cocaïne se fixe à un aptamère, le nombre d'aptamères immobilisés peut être estimé à 2,4 nmoles pour 35 mg de support sec, soit 69,2 nmoles/g de support sec.

Cette valeur est du même ordre de grandeur que les valeurs de capacité obtenues lors de la synthèse d'immunoadsorbants sur silice activée. Des capacités allant de 4 à 94 nmoles/g de support ont en effet été obtenus lors de l'immobilisation d'anticorps sur ce type de support [274]. A titre d'exemple, des travaux menés précédemment au laboratoire concernant l'immobilisation d'anticorps dirigés contre le 3-benzo(a)pyrene-glucuronide sur de la sépharose activée CNBr, ont montré une capacité de 3,4 nmoles par gramme de support sec pour l'immunoadsorbant [267]. De plus, une capacité de 28,3 nmoles/g de support a été obtenue pour des anticorps anti-cytochrome C immobilisés dans les mêmes conditions. L'immobilisation d'aptamères sur ce même support, en suivant une procédure d'immobilisation très proche, a donc mené à une capacité plus de deux fois supérieure. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer cette différence à l'avantage des oligoadsorbants. Tout d'abord, le greffage des aptamères modifiés s'effectue par un groupement fonctionnel, ici une amine, placée à une extrémité de la séquence de l'aptamère. Le greffage est donc orienté, contrairement au greffage d'anticorps qui s'effectue de manière aléatoire par les groupements amines présents au sein de la biomolécule. On estime qu'environ un anticorps greffé sur deux présente des sites de fixation accessibles, en raison du caractère aléatoire de leur greffage [112]. La proportion

d'aptamères actifs parmi l'ensemble des aptamères greffés serait donc plus élevée qu'avec les anticorps. D'autre part, les aptamères étant environ dix fois moins volumineux que les anticorps, une meilleure densité de greffage est attendue pour les oligoadsorbants.

Cette valeur de capacité nous indique que 2,4 nmoles d'aptamères sont greffées sur les 12,5 nmoles introduites. Le taux de greffage actif peut donc être estimé à 19,2%, valeur relativement proche de celle obtenue pour l'oligoadsorbant $COC_{Strepta}$ n°1 (25,1 %).

La comparaison avec la valeur de capacité de l'oligoadsorbant $COC_{Strepta}$ n°1 (690 ng) est délicate puisque la quantité de support introduite se mesure en masse sèche pour la sepharose activée CNBr, et en volume d'une solution possédant les billes de support activé en suspension pour l'agarose activée streptavidine. Le volume de gel formé dans la cartouche à partir de 35 mg de sepharose CNBr sèche a pu cependant être estimé à 113 µL en mesurant la hauteur de gel et le diamètre interne de la cartouche. Ainsi, la quantité d'aptamères actifs greffés a pu être évaluée à 2,12 nmoles pour 100 µL d'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 à base de sepharose CNBr, contre 1,33 nmoles pour 100 µL d'oligoadsorbant $COC_{Strepta}$ n°1 à base agarose activée streptavidine. La densité de greffage en aptamères actifs s'avère donc meilleure pour l'immobilisation sur sepharose activée CNBr.

4. Stabilité du support

Après une période de huit mois, pendant laquelle le support COC_{CNBr} n°1 a été utilisé à une trentaine de reprises, la rétention de la cocaïne sur cet oligoadsorbant a été étudiée afin d'évaluer sa stabilité. Le protocole d'extraction obtenu est présenté en figure 46.

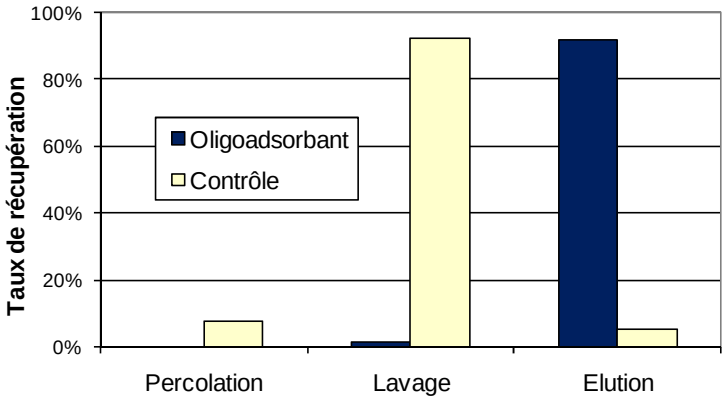


Figure 46 : Profil d'extraction correspondant à l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 synthétisé à partir de sepharose CNBr et obtenu huit mois après la synthèse. Procédure identique à celle de la figure 42.

Aucune perte de rétention n'est observée puisque le rendement d'extraction obtenu est de 92 %. L'immobilisation covalente des aptamères a donc permis l'utilisation d'une solution d'élution très éluante (eau/acétonitrile 60/40 (V/V)) sans causer de dommage à la phase stationnaire. D'autre part, les aptamères en série ADN utilisés s'avère suffisamment stables pour un stockage prolongé. La stabilité en milieu réel, notamment dans les fluides biologiques qui contiennent des nucléases, sera évaluée dans le chapitre suivant.

5. Répétabilité de la synthèse

Une seconde synthèse, suivant la même procédure, a été effectuée afin d'étudier la répétabilité du greffage des aptamères. Le profil d'extraction moyen obtenu pour trois répétitions avec cet oligoadsorbant COC_{CNBr} n°2 est présenté en figure 47.

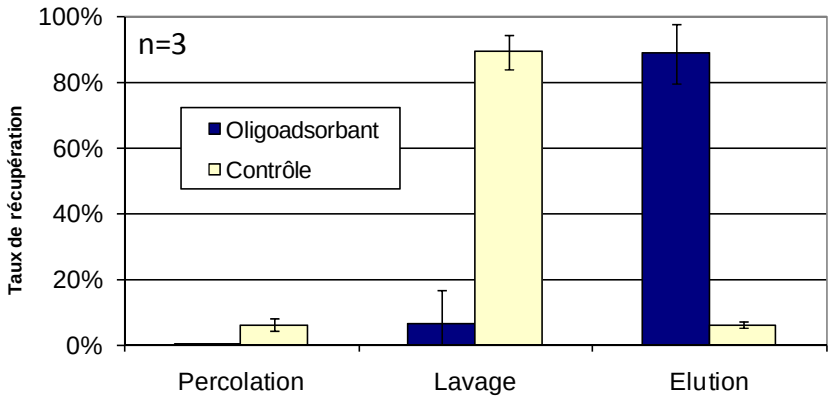


Figure 47 : Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°2 synthétisé à partir de sepharose CNBr. Procédure identique à celle de la figure 42

Ce profil d'extraction montre que les performances de ce second support sont très similaires au premier, puisque qu'un rendement d'extraction de 89 ± 9 % (n=3) a été obtenu contre 86 ± 10 % pour la première synthèse. La répétabilité de la synthèse semble donc satisfaisante. Il en va de même pour le support de contrôle pour lequel un rendement d'extraction de 6 ± 1 % a été obtenu pour les deux synthèses.

La capacité de cet oligoadsorbant COC_{CNBr} n°2 a également été mesurée. La courbe de capacité obtenue est présentée en figure 48.

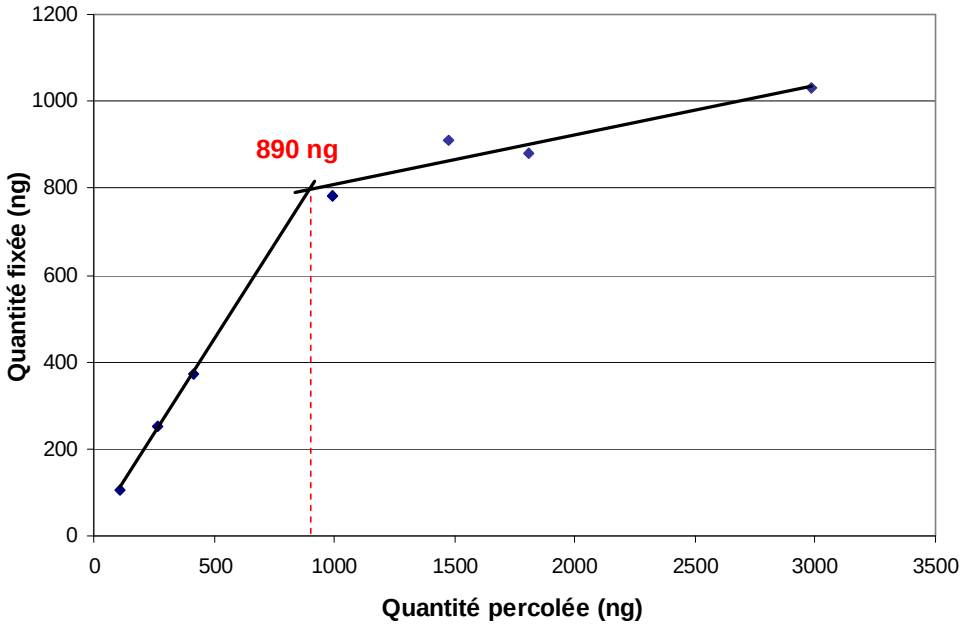


Figure 48 : Courbe de capacité obtenue pour l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°2 synthétisé à partir de sepharose CNBr

Une capacité de 890 ng a été obtenue, soit 2,95 nmoles. Cette valeur est relativement proche de celle mesurée sur l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 (730 ng) démontrant la bonne répétabilité de l'immobilisation des aptamères. La légère augmentation observée peut être due à des améliorations techniques apportée à la procédure d'immobilisation, telles que la modification de la taille du flacon utilisé pour le greffage, ou l'ajout d'une étape de rinçage avant l'étape d'immobilisation Cette valeur correspond à densité de greffage efficace de 83,5 nmoles/g de support, et à un taux de greffage actif de 23,6.

IV. Étude de l'influence de la longueur du bras espaceur

Pour le greffage sur sépharose activée CNBr, des aptamères amino-modifiés sont utilisés. Pour ce type de modification, deux longueurs de bras espaceurs sont commercialement disponibles : hexaméthylène [-$(CH_2)_6$-] (C6) et dodécaméthylène [-$(CH_2)_{12}$-] (C12). Ces deux espaceurs ont été comparés pour leur influence sur la rétention non spécifique et spécifique de la cocaïne, ainsi que sur le taux de greffage de l'aptamère. Tous les aptamères amino-modifiés utilisés précédemment ont été synthétisés avec un bras espaceur C6.

A. Influence sur la rétention non spécifique

Le bras espaceur étant de nature aliphatique, l'augmentation de sa longueur peut générer des interactions non spécifiques de type hydrophobe. Ce type d'interactions est à éviter pour minimiser la co-extraction de composés interférents. La rétention non spécifique a donc été évaluée et comparée pour les deux espaceurs. Pour ce faire, deux oligoadsorbants ont été synthétisés à partir d'un oligonucléotide amino-modifié à la séquence mélangée déjà utilisé précédemment (cf Chap3.III.D.2), l'un avec un espaceur C6 et l'autre avec un espaceur C12. Cet oligonucléotide est composé des mêmes nucléotides que l'aptamère anti-cocaïne mais placés dans un ordre aléatoire, il ne développe aucune interactions spécifiques avec la cocaïne. Ainsi une différence de rétention entre ces deux supports serait attribuée à une plus forte rétention non spécifique sur l'oligoadsorbant synthétisé avec l'espaceur C12.

Après la percolation de 200 µL de tampon de sélection dopé par de la cocaïne à 100 ppb, des fractions de lavage constituées de 100 µL de tampon de sélection sont passées à travers les deux supports jusqu'à élution totale de la cocaïne. La figure 49 compare les deux profils d'élution obtenus.

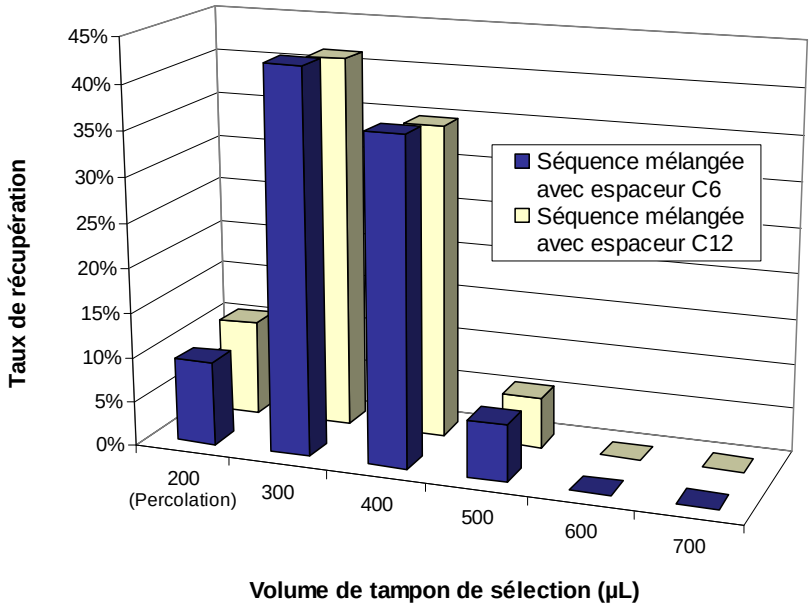


Figure 49 : Profils d'élutions obtenus sur les oligoadsorbants à base d'oligonucléotides inactifs et immobilisés avec des bras espaceurs différents. V=200 µL : Percolation (cocaïne à 100 ppb). De 300 à 700 µL : lavage par le tampon de sélection

On n'observe aucune différence de rétention entre les deux supports. L'utilisation d'un espaceur C12 pour la synthèse d'oligoadsorbants ne conduit donc pas à l'apparition d'interactions non spécifiques supplémentaires.

B. Influence sur la rétention spécifique

Pour cette étude, un oligoadsorbant avec un espaceur C12 a été synthétisé selon la procédure d'immobilisation utilisée pour l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1, qui possède un espaceur C6. La rétention spécifique a ensuite été évaluée de la même manière que précédemment : percolation de 200 µL de tampon de sélection dopé par de la cocaïne à 100 ppb puis élution par des fractions de lavage successives constituées de 100 µL de tampon de sélection. La figure 50 présente les pourcentages élués cumulés pour l'oligoadsorbant avec l'espaceur C12 en fonction du volume de tampon de sélection passé à travers les cartouches et compare ces résultats avec ceux précédemment obtenus sur l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1. Ces profils sont également comparés à celui obtenu sur un support de contrôle sur lequel aucun oligonucléotide n'est greffé.

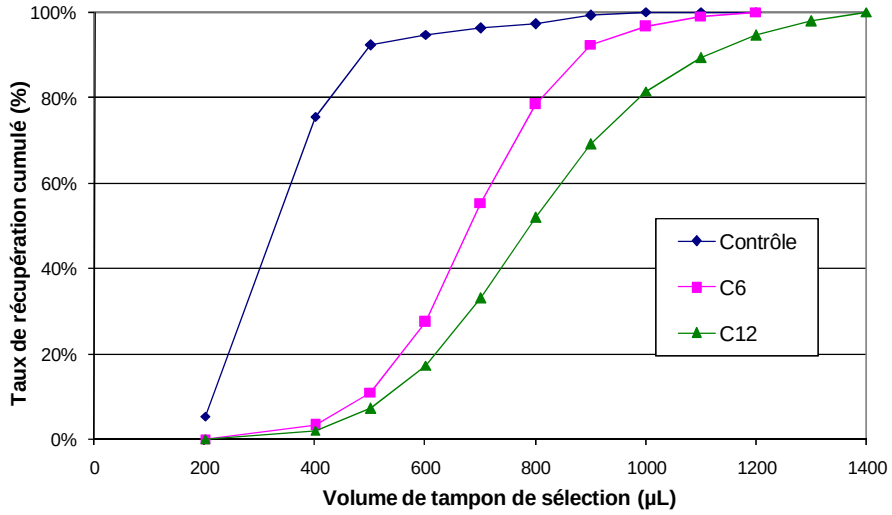


Figure 50 : Profils d'élution obtenus sur des oligoadsorbants synthétisés avec un espaceur C6 (COC_{CNBr} n°1) ou C12 et sur le support de contrôle

Bien que la rétention de la cocaïne sur ces deux oligoadsorbants soit très similaire, on observe que celle de l'oligoadsorbant avec l'espaceur C12 est légèrement supérieure. En effet, l'élution totale de la cocaïne intervient légèrement plus tôt pour l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1. Cette différence de rétention peut provenir d'une valeur de capacité légèrement supérieure pour l'oligoadsorbant avec un espaceur C12, liée à une meilleure immobilisation de greffage avec cet espaceur. Cependant, l'étalement du profil, montre que cette différence de volume d'élution nécessaire est aussi liée à une cinétique défavorable pour l'oligoadsorbant avec espaceur C12.

Cependant, les deux courbes ont des allures quasiment superposables pour les faibles volumes percolés. Le volume de fin de fixation, qui est le paramètre clé

dans le développement d'une procédure d'extraction, est donc similaire pour les deux supports. La procédure d'extraction précédemment développée pour l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 est donc applicable aux deux oligoadsorbants. Le profil d'extraction moyen obtenu sur l'oligoadsorbant avec l'espaceur C12 après trois répétitions de la procédure d'extraction est présenté en figure 51.

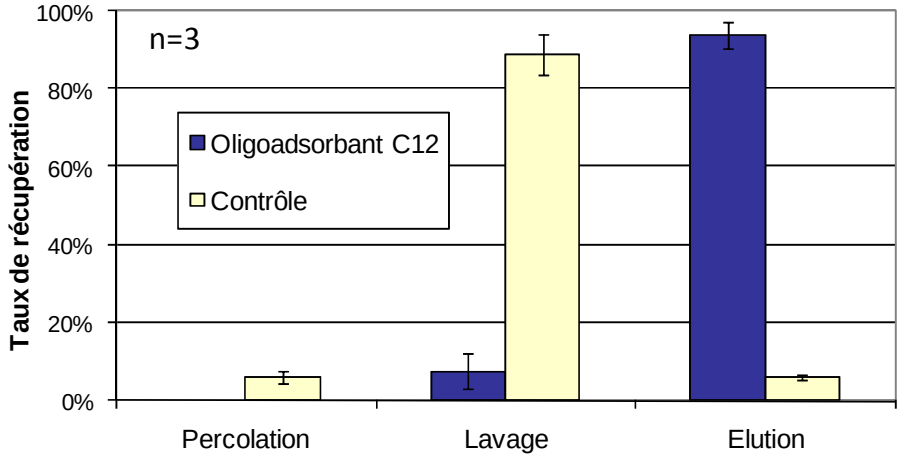


Figure 51 : Profil d'extraction moyen obtenu sur l'oligoadsorbant avec un espaceur C12. Procédure suivie identique à celle développée précédemment. (cf figure 42)

Le profil obtenu est très proche de celui de l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1, qui possède un espaceur C6. En effet, un rendement d'extraction de 94 ± 3 % a été mesuré contre 86 ± 10 % pour l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1.

L'influence de la longueur du bras espaceur sur le taux de greffage a ensuite été étudiée pour tenter d'expliquer la meilleure rétention obtenue sur l'oligoadsorbant avec l'espaceur C12.

C. Influence sur le greffage

1. Mise au point d'une méthode de dosage des aptamères

Une méthode d'analyse par chromatographie de paire d'ions, avec comme agent d'appariement l'ion triéthylammonium, et couplée à une détection par absorbance UV a été développée afin de quantifier les aptamères. Cette méthode d'analyse, détaillée en annexe 4, a permis de quantifier les aptamères dans la solution de couplage à la fin du greffage ainsi que dans les solutions provenant des différents lavages de l'oligoadsorbant réalisés après le greffage pour éliminer les aptamères uniquement adsorbés sur le support. Connaissant la quantité d'aptamère

introduite pour le greffage, la quantité totale d'aptamères greffés peut alors être déduite des valeurs retrouvées dans les différentes solutions analysées.

Du fait du fort coefficient d'extinction molaire des oligonucléotides, la méthode s'est avérée très sensible puisque la limite de détection a été estimée à 6,5 ppb. La séparation est réalisée en mode gradient avec une variation du pourcentage d'acétonitrile de 7 à 14,5% en 30 min. Ce gradient doit être lent car le facteur de rétention des oligonucléotides dans ces conditions dépend très fortement du pourcentage d'acétonitrile. En effet, une étude de Gilar et al sur un oligonucléotide constitué de 30 thymines a montré que le facteur de rétention a été divisé par 44 en passant de 10 à 13 % d'acétonitrile, dans des conditions identiques et sur une colonne de dimension 30 x 4,6 mm (dp=2,5 µm) [275]. La figure 52 présente les chromatogrammes issus de l'injection d'aptamères avec espaceur C6 ou C12.

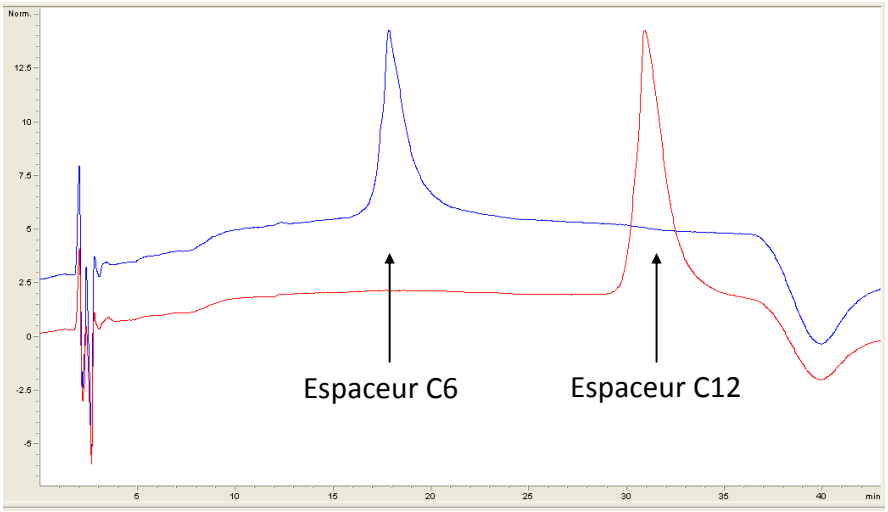


Figure 52 : Chromatogrammes correspondant à l'injection d'aptamères avec espaceur C6 ou C12. La quantité injectée correspond à l'injection de la solution de greffage diluée 125 fois (~ 8 ppm)

Comme l'illustre la figure 52, les aptamères sont séparés selon la longueur du bras espaceur. La largeur des pics peut être liée à la faible efficacité généralement observée paire d'ion, à la faible pente du gradient utilisé ainsi qu'à la pureté des aptamères dont la valeur est comprise entre 80 et 85 %.

La stratégie consistant à quantifier les aptamères dans la solution de greffage au début et à la fin de l'immobilisation a été appliquée dans un premier temps sur l'immobilisation d'un aptamère possédant un bras espaceur C6, appelé COC_{CNBr} n°3. Seulement 37 % de la quantité d'aptamère introduite sont retrouvés dans le surnageant à la fin du greffage, laissant penser que le rendement de greffage obtenu est de 63 %. Cependant, lors du lavage de l'oligoadsorbant réalisé instantanément

après la synthèse, les fractions de lavage ont été collectées et analysées et 28 % de la quantité d'aptamère introduite ont été retrouvés. Ce résultat abaisse alors le rendement de greffage à 35 % et démontre que l'analyse du surnageant au début et à la fin du greffage, méthode simple et souvent utilisée dans la littérature, ne suffit pas pour estimer le rendement de greffage. De nombreux aptamères sont donc uniquement adsorbés sur le support et éliminés par les différents lavages réalisés après le greffage, qui doivent être collectés et analysés.

2. Étude du taux de greffage

Trois nouvelles synthèses de chaque oligoadsorbant, C6 et C12, ont été réalisées en quantifiant les aptamères dans les solutions de greffage et de lavage afin de déterminer le taux de greffage. La figure 53 rassemble les taux de greffages obtenus pour chaque synthèse.

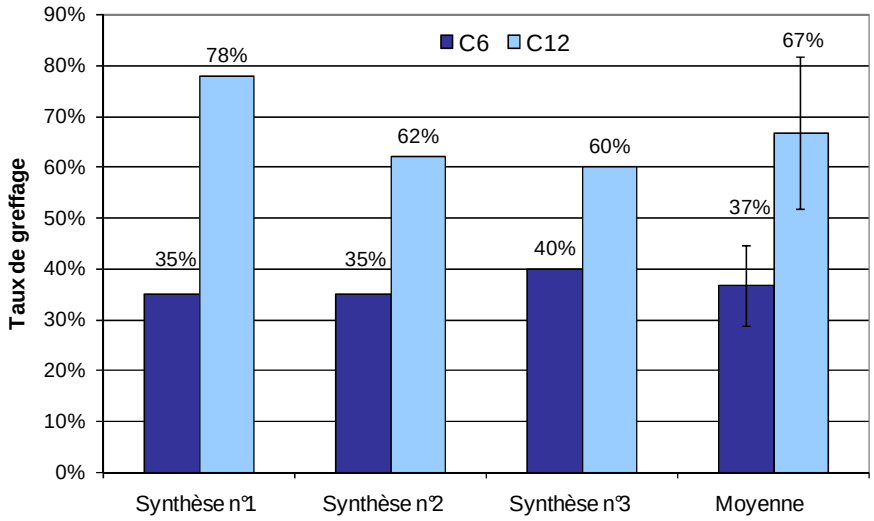


Figure 53 : Taux de greffages mesurés par quantification des aptamères dans les solutions de greffage et de lavage pour trois synthèses d'oligoadsorbants C6 et C12.

Des taux de greffage moyens de 37 œ 8 % et 67 œ 15 % ont été obtenus respectivement pour les oligoadsorbants C6 et C12. Cette différence est probablement due à une meilleure accessibilité de la fonction amine impliquée dans la réaction de greffage lorsqu'elle est portée par un espaceur C12.

Cependant, ce taux de greffage prend en compte tous les aptamères greffés, qu'ils soient actifs ou non. Certains d'entre eux peuvent avoir été immobilisés avec une mauvaise orientation, c'est-à-dire par un groupement amine d'une base azotée empêchant ainsi l'aptamère d'adopter sa conformation active. D'autres peuvent être fixés au support en plusieurs points, par exemple par l'amine terminale et par une amine d'une base azotée ayant réagi sur un autre site actif du support activé. Des

mesures de capacité doivent être effectuées afin d'évaluer et de comparer la quantité d'aptamères actifs greffés sur chacun de ces supports.

D. Influence sur la capacité du support

La capacité d'un oligoadsorbant synthétisé avec un espaceur C12 (synthèse n°1) a été évaluée et comparée avec celle obtenue pour l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 synthétisé avec un espaceur C6 (cf Chap 3.III.D.3). La figure 54 présente la courbe de capacité obtenue pour l'oligoadsorbant synthétisé à l'aide d'un espaceur C12.

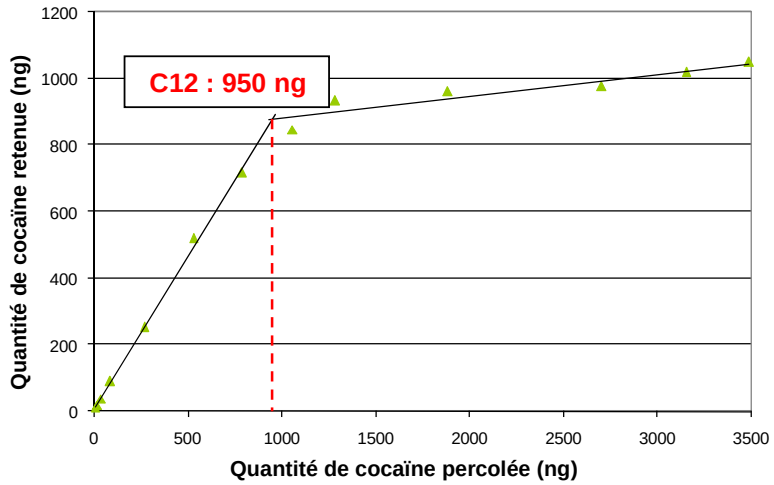


Figure 54 : Courbe de capacité obtenue sur un oligoadsorbant synthétisé avec un espaceur C12 (Synthèse n°1).

Une valeur de 950 ng a été estimée pour cet oligoadsorbant avec espaceur C12, alors qu'une valeur de 730 ng avait été obtenue sur l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1, qui possède un espaceur C6. Cela correspond à des quantités d'aptamères actifs greffés de 3,1 nmoles pour l'oligoadsorbant avec espaceur C12, et 2,4 nmoles pour l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1. Sachant que 12,5 nmoles d'aptamères ont été introduites pour le greffage dans les deux cas, ces valeurs correspondent à des taux de greffages actifs de 19% pour l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 et de 25% pour l'oligoadsorbant avec espaceur C12.

Une différence plus marquée était attendue au vu des résultats obtenus pour les taux de greffage totaux. En effet, alors que l'utilisation de l'espaceur C12 a conduit à des taux de greffages presque deux fois supérieurs à l'espaceur C6, les valeurs de capacités observées sont relativement proches. Le greffage avec espaceur C12 conduit donc à une proportion d'aptamères greffés inactifs plus importante. En

revanche, l'immobilisation d'aptamères avec espaceur C6 semble être moins efficace en termes de taux de greffage total mais mène à une plus grande proportion d'aptamères greffés actifs (51% contre seulement 37% pour les aptamères avec espaceur C12). Il faut toutefois noter que la pureté des aptamères (comprise entre 80 et 85 %) n'est pas prise en compte dans ces calculs de proportion d'aptamères greffés actifs, ces deux valeurs de taux de greffage actifs sont donc sous-estimées.

E. Conclusions

Les oligoadsorbants synthétisés avec des espaceurs C6 et C12 ont des performances très similaires. Toutefois, l'oligoadsorbant avec espaceur C6 est choisi pour l'extraction de la cocaïne de milieux réels. En effet, le fait que le bras espaceur soit moins long, et que le nombre d'aptamères greffés inactifs soit réduit sur ce support amoindrit le risque de co-extraire des composés interférents retenus par interactions non spécifiques.

Il serait cependant intéressant de réaliser des études complémentaires concernant l'oligoadsorbant avec espaceur en C12. En effet, les taux de greffage totaux atteints par ce support suggèrent un grand potentiel pour obtenir des capacités plus élevées. Des stratégies pour augmenter la proportion d'aptamères actifs parmi les aptamères greffés devront être employées, comme par exemple le greffage de l'aptamère en présence de cocaïne, de sorte à favoriser la structure à trois tiges boucles de l'aptamère qui protègerait les amines des bases azotées et favoriserait le greffage spécifique par l'amine terminale. Le greffage de l'aptamère sous une forme double brin est également envisageable afin que la structure en double hélice protège les amines des bases azotées. Le brin complémentaire de l'aptamère pourrait ensuite être éliminé par chauffage ou par passage d'un agent chaotropique comme l'urée.

V. Transposition des procédures de synthèse à l'oligoextraction de l'ochratoxine A

Les deux supports d'immobilisation ayant conduit à des oligoadsorbants anti-cocaïne performants ont été utilisés pour l'immobilisation d'un second aptamère : l'aptamère anti-OTA. Les performances des oligoadsorbants obtenues seront comparées à celles obtenues sur les oligoadsorbants anti-cocaïne afin de s'assurer que ces méthodes d'immobilisation sont transposables aux autres aptamères.

L'ochratoxine A est analysée par chromatographie liquide de partage à phases inversées, couplée à une détection par fluorescence. Les conditions analytiques sont décrites en annexe 3.

A. Immobilisation sur de l'agarose activée streptavidine

La procédure d'immobilisation suivie est identique à celle suivie pour l'oligoadsorbant anti-cocaïne, à savoir l'incubation de 9 nmoles d'aptamères biotinylés avec 300 µL de la solution de billes d'agarose activée en suspension. L'oligoadsorbant obtenu est appelé $OTA_{Strepta}$.

1. Volume de fin de fixation

Pour les oligoadsorbants anti-ochratoxine, le tampon utilisé pour les étapes de conditionnement, de percolation et de lavage n'est pas le tampon de sélection mais le tampon de fixation dans lequel l'affinité de l'aptamère pour l'ochratoxine A est supérieure (cf section Chap3.I.B). Comme pour les oligoadsorbants anti-cocaïne, les étapes de conditionnement, percolation et lavage sont réalisées à 4°C. Après une première étape de percolation par du tampon de fixation dopé par de l'ochratoxine (10 ng/L), puis le passage de plusieurs fractions de lavage constituées de tampon de fixation, le volume de fin de fixation est repéré au volume pour lequel l'ochratoxine commence à être éluée. Le profil d'élution obtenu est présenté en figure 55.

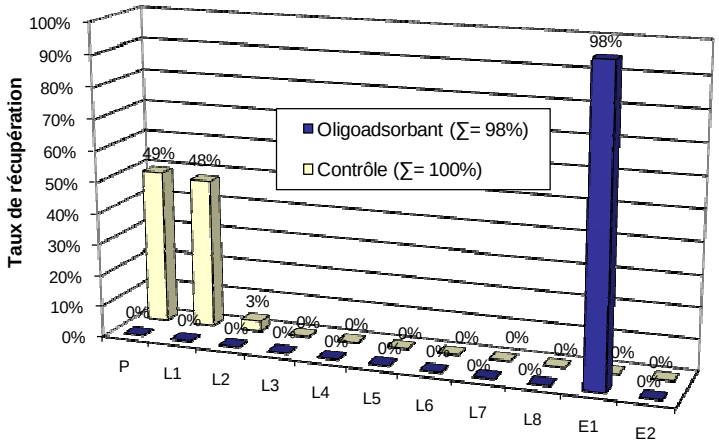


Figure 55 : Profil d'élution pour l'évaluation du volume de fin de fixation. P : percolation de 500 µL de tampon de fixation dopé à 10 ng/L par de l'ochratoxine (T=4°C) ; L1 à L7 : lavages par 1 mL de tampon de fixation (T=4°C) ; L8 : lavage par 1 mL d'un mélange tampon de fixation/acétonitrile 90/10 (V/V). (T=4°C) ; E : élution par 1 mL d'un mélange eau/acétonitrile 90/10 (V/V) à température ambiante.

On observe une très grande différence de rétention entre l'oligoadsorbant $OTA_{Strepta}$ et le support de contrôle. En effet, la quasi-totalité de l'OTA est éluée après la première fraction de lavage L1 sur le support de contrôle, soit après le passage de 1,5 mL de tampon de fixation, alors qu'elle était toujours retenue sur l'oligoadsorbant après la $7^{ème}$ fraction de lavage L7, soit après le passage de 7,5 mL de tampon de fixation. Cette rétention spécifique traduit la réussite de la réaction d'immobilisation. De plus, le volume de fin de fixation de l'OTA dans le tampon de fixation est donc supérieur à 8,5 mL. Cet oligoadsorbant anti-OTA se montre donc beaucoup plus rétentif que l'oligoadsorbant anti-cocaïne $COC_{Strepta}$ n°1, pour lequel la valeur de Vf sur ce support a été estimée entre 500 µL et 1 mL (cf figure 35). Cette forte différence de rétention peut être attribuée à la différence d'affinité des deux aptamères. En effet, le complexe aptamère anti-OTA/OTA possède une constante de dissociation 100 fois inférieure à celle du complexe aptamère anti-cocaïne / cocaïne. Cette très forte rétention permettra donc la percolation sur cet oligoadsorbant de grands volumes d'échantillon, ou le passage de fractions de lavage de volumes importants.

Dans le but d'obtenir une procédure d'extraction optimale en termes de purification, la possibilité d'appliquer une fraction de lavage plus éluante a été étudiée. Comme aucune trace d'OTA n'a été retrouvée dans la fraction L8 constituée d'un millilitre à 4°C du tampon de fixation contenant 10 % d'acétonitrile, cette solution pourra donc être employée pour l'étape de lavage de la procédure d'extraction. 98 % de l'OTA percolée sont retrouvés dans la première fraction d'élution constituée d'un mélange eau/acétonitrile 90/10 (V/V) à température ambiante, ce qui indique qu'un volume de 1 mL est suffisant pour l'élution de l'analyte par cette solution. Cette solution pourra donc également être retenue pour la mise au point d'un protocole d'extraction optimisé.

2. Optimisation du protocole d'extraction

Le protocole d'extraction a été établi en fonction des résultats précédents. Le volume de percolation a été fixé à 500 µL de tampon de fixation et la fraction de lavage à 1 mL d'un mélange tampon de fixation/acétonitrile 90/10 (V/V) à 4°C. Dans le but de rechercher les conditions d'élution les plus douces possibles pour ne pas risquer de détériorer la liaison biotine/streptavidine, une fraction d'élution constituée de 1 mL d'eau pure à température ambiante a été appliquée. La figure 56 présente la moyenne de trois répétitions d'extractions réalisées en suivant cette procédure.

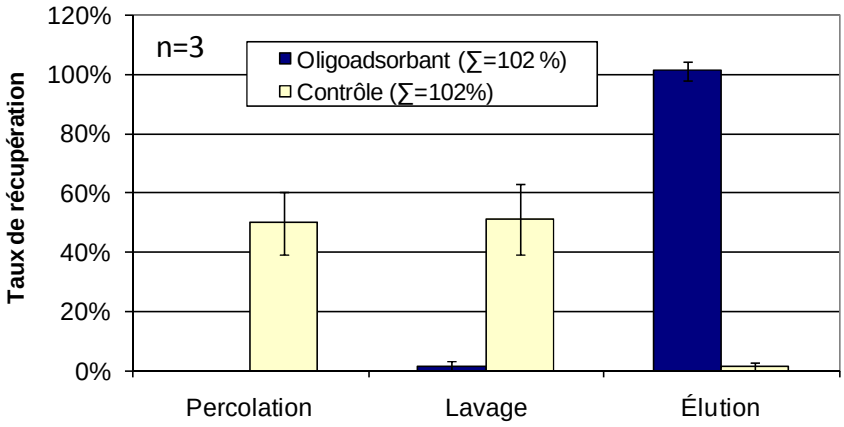


Figure 56 : Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant $OTA_{Strepta}$ synthétisé à partir d'agarose activée streptavidine. Percolation : 500 µL tampon de fixation dopé par le l'OTA à 1 ppb (T=4°C). Lavage : 1 mL tampon de fixation/acétonitrile 90/10 (V/V) (T=4°C). Élution, 1000 µL eau pure (T=25°C).

Le rendement d'extraction moyen obtenu est de 101 %, avec un écart type de 3 %, démontrant la bonne répétabilité du profil. Le profil du support de contrôle montre que les étapes de percolation et de lavage sont suffisantes pour éluer les composés retenus sur le support de contrôle par interactions non spécifiques. De plus, la totalité de l'OTA est éluée de l'oligoadsorbant avec une solution d'élution composée uniquement d'eau pure à température ambiante. Il semblerait donc que l'aptamère anti-OTA ait besoin de conditions d'élution différentes pour être dénaturé, puisque une élution par de l'eau pure à 60 °C n'était pas suffisante pour l'aptamère anti-cocaïne (cf figure 35).

La capacité de cet oligoadsorbant $OTA_{Strepta}$ a ensuite été évaluée afin d'être comparée à celle de l'oligoadsorbant anti-cocaïne, synthétisé en suivant la même procédure d'immobilisation.

3. Capacité du support

La courbe de capacité obtenue pour cet oligoadsorbant $OTA_{Strepta}$ est présentée en figure 57.

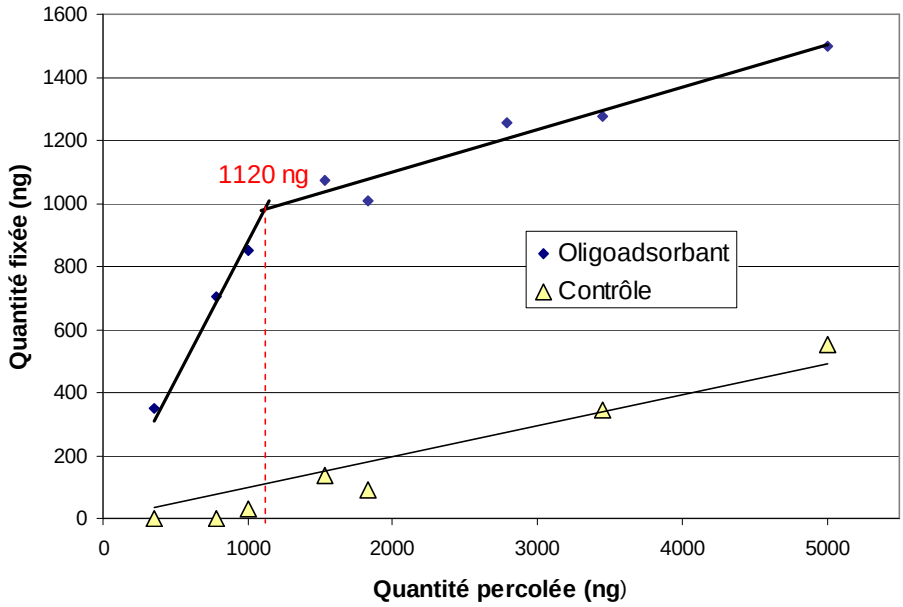


Figure 57 : Courbe de capacité de l'oligoadsorbant $OTA_{Strepta}$ et de son support de contrôle synthétisés à partir d'agarose activée streptavidine

La valeur mesurée sur ce support est de 1120 ng d'OTA, soit 2,77 nmoles pour un volume de gel estimé à 311 µL. Ceci correspond à une quantité d'aptamères actifs greffés de 0,89 nmoles pour 100 µL de support. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle obtenue pour l'oligoadsorbant anti-cocaïne $COC_{Strepta}$ n°1 (1,33 nmoles pour 100 µL de support) ce qui laisse penser que cette méthode d'immobilisation des oligonucléotides serait transposable à d'autres aptamères et permettrait l'obtention de capacité de l'ordre de la nanomole pour 100 µL de support. Le pourcentage d'aptamères greffés et actifs représente 21,7 % de la quantité introduite pour le greffage. Concernant le support de contrôle, on vérifie une nouvelle fois que la quantité d'OTA retenue par interactions on spécifiques augmente proportionnellement à la quantité percolée.

Comme pour l'oligoadsorbant anti-cocaïne, un oligoadsorbant anti-OTA synthétisé à partir de sepharose activée CNBr a également été caractérisé.

B. Immobilisation sur de la sépharose activée bromure de cyanogène

Des aptamères amino-modifiés ont été immobilisés sur de la sépharose activée CNBr selon la procédure développée précédemment pour la synthèse d'un oligoadsorbant anti-cocaïne. La rétention de l'OTA sur ce support, appelé OTA_{CNBr}, a été étudiée pour déterminer le volume de fin de fixation.

1. Volume de fin de fixation

Ici encore, une fraction de percolation constituée de tampon de fixation dopé par de l'ochratoxine (5 ng/L) est appliquée sur le support, et est suivie du passage de plusieurs fractions de lavage constituées de tampon de fixation. Le volume de fin de fixation correspond au volume pour lequel l'ochratoxine commence à être éluée. Le profil d'élution obtenu est présenté en figure 58.

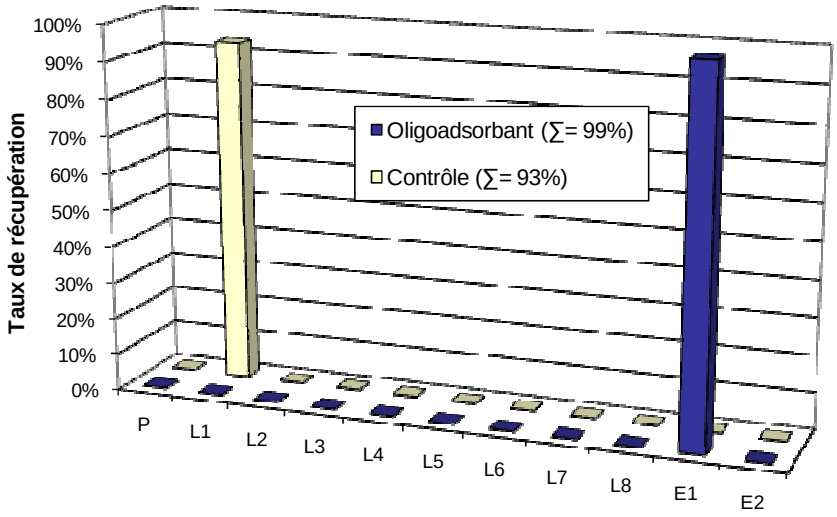


Figure 58 : Profil d'élution pour l'évaluation du volume de fin de fixation. P : percolation de 100 µL de tampon de fixation dopé à 5 ng/L par de l'ochratoxine (T=4°C) ; L1 à L8 : lavages par 1 mL de tampon de fixation (T=4°C) ; E : élution par 500 µL d'un mélange eau/acétonitrile 60/40 (V/V) à température ambiante.

Ici encore, la forte différence de rétention observée entre l'oligoadsorbant et le support de contrôle témoigne de la réussite de l'immobilisation des aptamères. Aucune trace de cocaïne ayant été retrouvée après 8 mL de tampon de fixation, l'élution a été provoquée par 500 µL d'une solution eau/acétonitrile 60/40 (V/V). Le volume de fin de fixation sur l'oligoadsorbant OTA_{CNBr} est donc supérieur à 8 mL, alors que la totalité de l'OTA percolée sur le support de contrôle est éluée après 1 mL de lavage.

2. Protocole d'extraction

Un protocole d'extraction a ensuite été développé pour ce support. Le protocole testé est constitué d'une fraction de percolation de 1 mL de tampon de fixation dopé par de l'OTA, d'un lavage par 1 mL de tampon de fixation contenant 10 % d'acétonitrile pour en augmenter la force éluante, et d'une élution par 500 µL d'un mélange eau/acétonitrile 60/40 (V/V). La figure 59 présente la moyenne de trois profils obtenus avec ce protocole.

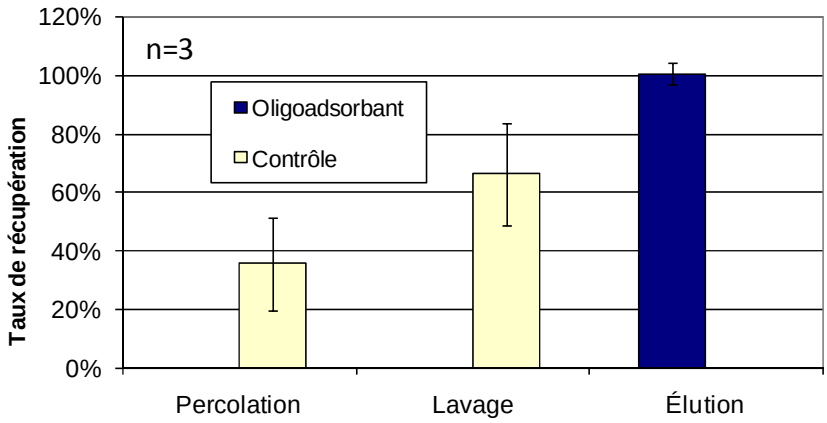


Figure 59 : Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant OTA_{CNBr} synthétisé à partir de sepharose activée CNBr. Percolation : 1 mL tampon de fixation dopé par de l'OTA à 1 ppb (T=4°C). Lavage : 1 mL tampon de fixation/acétonitrile 90/10 (V/V) (T=4°C). Élution, 500 µL eau/acétonitrile 60/40 (V/V) (T=25°C).

Le rendement d'extraction obtenu avec cette procédure est de 100 % avec un écart type de 4 % (n=3). La rétention est donc assez forte pour permettre un lavage par une solution contenant 10 % d'acétonitrile sans affecter la rétention de l'OTA. La stabilité de cet oligoadsorbant synthétisé par une immobilisation covalente permet l'utilisation d'une solution d'élution plus éluante, ce qui réduit le volume requis pour l'élution de toute l'OTA percolée.

La simplicité du protocole d'extraction des oligoadsorbants rend son développement très rapide. Ceci constitue un avantage majeur des oligoadsorbants devant les MIP, pour lesquels la procédure d'extraction peut être très complexe et longue à développer.

3. Capacité du support

La courbe obtenue lors de l'évaluation de la capacité de cet oligoadsorbant OTA_{CNBr} est présentée en figure 60.

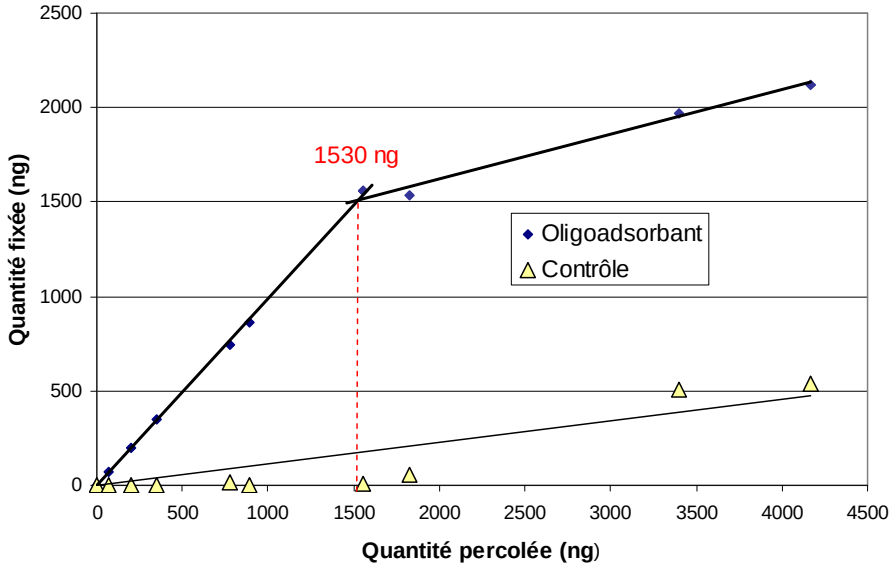


Figure 60 : Courbe de capacité de l'oligoadsorbant OTA_{CNBr} et de son support de contrôle synthétisés à partir de sepharose activée CNBr

La courbe obtenue permet d'évaluer la capacité du support à 1530 ng, soit 3,8 nmoles (contre 2,8 nmoles pour l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1). Cette valeur correspond à 108,3 nmoles par gramme de support sec ou encore à 3,35 nmoles pour 100 µL de support. Le pourcentage d'aptamères greffés et actifs représente 29,8 % de la quantité introduite pour le greffage.

C. Comparaison des oligoadsorbants

Les densités de greffage observées pour les aptamères anti-cocaïne et anti-OTA prouvent que les méthodes d'immobilisation développées sont transposables d'un aptamère à l'autre. Cette propriété des oligoadsorbants représente un important avantage devant les polymères à empreintes moléculaires. En effet, leur synthèse nécessite le plus souvent une optimisation du choix du monomère, de l'agent réticulant et de leurs proportions relatives. D'autre part, le développement d'une procédure d'extraction d'échantillons aqueux est souvent très complexe (cf Chap1.II.E.7)

Le tableau 4 rassemble les différents résultats obtenus pour les greffages des aptamères anti-cocaïne et anti-OTA sur les supports de sepharose CNBr et d'agarose streptavidine.

	Capacité de l'oligoadsorbant (ng)		Capacité pour 100 µL de support (nmoles)		Taux de greffage actif (%)	
	COC	OTA	COC	OTA	COC	OTA
Sepharose CNBr (35 mg secs)	(n°1) 730 (n°2) 890	1530	(n°1) 2,12 (n°2) 2,61	3,35	(n°1) 19,2 (n°2) 23,6	29,8
Agarose streptavidine (300 µL de suspension)	690	1120	1,33	0,89	25,1	21,7

Tableau 4 : Bilan des études de capacité des oligoadsorbants avec espaceur C6 synthétisés. Touts les solutions de greffage contiennent 150 µg d'aptamères.

Les résultats obtenus sur les différents oligoadsorbants sont relativement similaires, d'autant plus que la valeur légèrement supérieure obtenue sur l'oligoadsorbant OTA_{CNBr} peut s'expliquer par les améliorations techniques progressivement apportées à la procédure de greffage ainsi qu'au savoir-faire acquis.

VI. Influence de la composition du tampon sur la rétention

A. Données sur l'influence des ions divalents sur l'aptamère anti-OTA

L'étude de Cruz-Aguado et Penner menée en 2008 sur l'optimisation de l'affinité de l'aptamère anti-OTA en fonction de la composition du tampon dans lequel il se trouve [164] a prouvé que le tampon de sélection n'est pas obligatoirement celui qui engendre la meilleure affinité. La concentration en cations divalents semble notamment être un paramètre très important à prendre en compte. Les résultats obtenus sont rappelés dans le paragraphe suivant et complétés par d'autres résultats acquis au cours de cette thèse. Le comportement de l'aptamère anti-cocaïne a ensuite été étudié pour la première fois dans le but d'abaisser sa constante de dissociation.

Cruz-Aguado et Penner [164] ont observé une augmentation de l'affinité de l'aptamère lors de l'augmentation de la concentration de 5 mM à 20 mM en ion Mg^{2+}. Étonnamment, le remplacement des ions magnésium par des ions calcium a

également conduit à une amélioration significative de l'affinité. Grâce à ces modifications de la composition du tampon en cations divalents, la constante de dissociation a été abaissée de 0,2 µM à 49 nM. La figure 61 présente les affinités obtenues en fonction de la nature et de la concentration du cation divalent.

	K_d (nM)	
concentration (mM)	Mg^{2+}	Ca^{2+}
0	NB	NB
5	197 ± 74	112 ± 12
10	148 ± 8	54 ± 8
20	118 ± 46	49 ± 3

Figure 61 : Constantes d'affinité mesurées en fonction de la nature et de la concentration du cation divalent utilisé. NB : aucune affinité. Adapté de [164]

Ces résultats indiquent donc que le rayon et le volume occupé par les ions jouent un rôle primordial pour l'établissement de fortes interactions.

Étant donnée la nette amélioration de l'affinité de l'aptamère OTA par l'optimisation de la nature et de la concentration en cations divalents, une étude similaire a été effectuée sur l'aptamère anti-cocaïne.

B. Étude de l'influence des ions divalents sur l'aptamère anti-cocaïne

Le volume de fin de fixation sur un oligoadsorbant issu d'une nouvelle synthèse, appelé COC_{CNBR} n°3, a été évalué dans des solutions contenant différentes concentrations en Mg^{2+}, Ca^{2+}, et également Mn^{2+}, qui a montré son influence sur l'affinité de certains aptamères vis-à-vis de leur cible [276]. Ces solutions ont été préparées en remplaçant uniquement la concentration en magnésium dans le tampon de sélection ([Tris]=20 mM, [NaCl]=140 mM, [KCl]=5 mM, pH=7,4) par le cation étudié à des concentrations de 1 et 5 mM. La rétention dans le tampon de sélection privé de tout cation divalent a également été étudiée. Pour chaque expérience, la solution étudiée est utilisée pour le conditionnement de support (5mL), la percolation (200 µL dopés par de la cocaïne), et les fractions de lavages successives conduisant à élution totale de la cocaïne (fractions de 200 µL). Les profils d'élution représentant les taux de récupération cumulés pour chaque support en fonction du volume de tampon de sélection percolé sont présentés en figure 62.

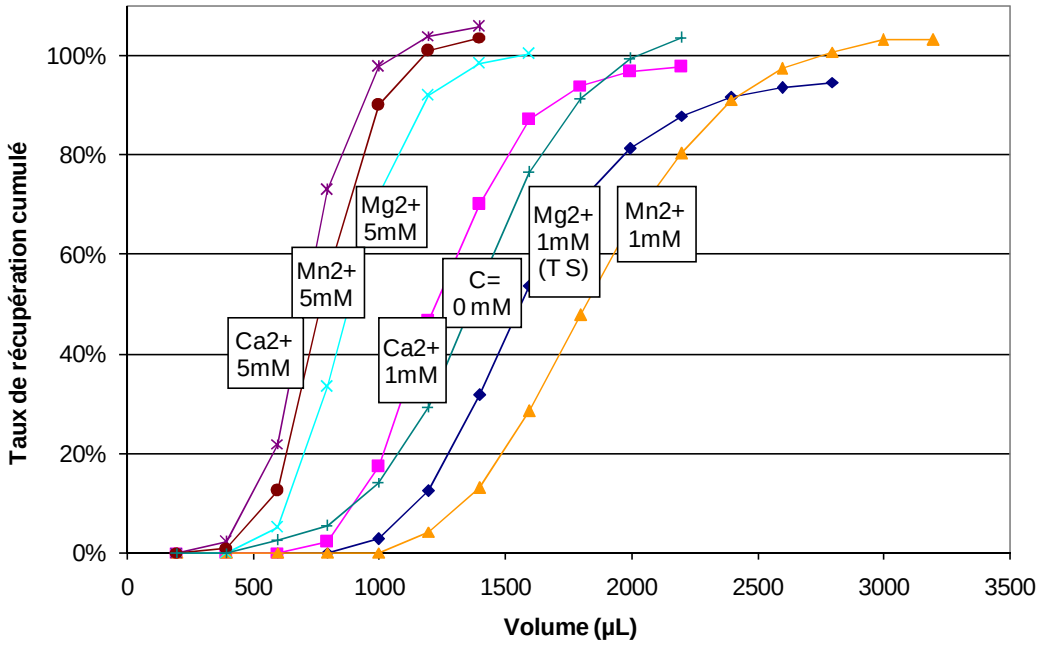


Figure 62 : Profils d'élution de la cocaïne en fonction de la nature et de la concentration du cation divalent présent dans le tampon. (T.S. : tampon de sélection)

Le comportement observé est totalement différent de l'aptamère anti-OTA. En effet, on observe que, quelque soit le cation divalent, l'augmentation de sa concentration entraîne une diminution de l'affinité de l'aptamère. D'autre part, la solution sans cations divalents conduit à une rétention très proche de celle du tampon de sélection ($[Mg^{2+}]$ = 1 mM), alors qu'elle provoque l'annulation totale de l'affinité pour l'aptamère anti-OTA [164]. D'autre part, le calcium entraîne une moins bonne rétention que le magnésium pour les deux concentrations testées contrairement à l'aptamère anti-OTA. Seule la solution contenant 1 mM de Mn^{2+} a permis d'obtenir une rétention légèrement meilleure qu'avec le tampon de sélection. Néanmoins, l'utilisation du tampon de sélection dans la procédure d'extraction est conservée. En effet, les fluides biologiques destinés à être extraits par l'oligoadsorbant anti-cocaïne contiennent une concentration en magnésium proche de 1 mM, la concentration en cations divalents n'a donc pas à être ajustée.

C. Commentaires sur les évolutions de la procédure de synthèse

On peut remarquer que la rétention sur cet oligoadsorbant COC_{CNBr} n°3, issu d'une nouvelle synthèse, est particulièrement importante. En effet, environ 1500 µL de tampon de sélection sont nécessaires pour éluer 50 % de la cocaïne percolée alors que 800 µL étaient suffisant pour l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 sur lequel la

procédure d'extraction a été développée (cf figure 41). Ceci s'explique par le fait que cette nouvelle synthèse, réalisée en fin de thèse, a profité de l'expérience et du savoir-faire acquis au cours des premières synthèses et a bénéficié d'améliorations techniques. En effet, toutes les études de rétention et de capacité décrites précédemment dans ce chapitre correspondent aux premières synthèses réalisées. La procédure d'immobilisation a notamment été optimisée depuis ces premières synthèses, en ajoutant une étape de rinçage à l'eau (1mL), suivie d'un autre rinçage au tampon phosphate (Na_2HPO_4 à 200 mM et $MgCl_2$ à 5 mM, 175 µL, pH=8) du support activé avant l'incubation des aptamères. Le flacon dans lequel a lieu la réaction d'immobilisation a lui aussi été modifié. D'un volume d'un millilitre pour les premières synthèses, des inserts de 400 µL ont ensuite été utilisés afin de limiter la dispersion de la phase sur la surface du flacon, et ainsi faciliter l'homogénéisation. Au vu de la rétention obtenu sur les dernières synthèses, ces différentes améliorations semblent conduire à des résultats prometteurs.

D. Discussion

Ces différents résultats montrent que les cations divalents sont d'une importance primordiale pour l'affinité de l'aptamère envers sa cible. Ceci peut s'expliquer par leur action à la fois sur la structure de l'aptamère mais également sur les liaisons les plus énergétiques développées entre un aptamères et sa cible que sont les interactions électrostatiques.

Pour comprendre les phénomènes mis en jeu et ainsi pouvoir tenter de prévoir les conditions dans lesquelles l'affinité sera la meilleure, une étude plus approfondie sur l'effet de la force ionique, du pH et de leurs combinaisons serait nécessaire. Cependant, quelques interprétations peuvent être avancées à partir de ces résultats préliminaires. En effet, les aptamères pour lesquels l'influence des cations divalents sur l'affinité a été étudiée peuvent être classés en deux catégories. Les aptamères dont l'affinité augmente avec la concentration en cations divalents comme l'aptamère anti-OTA, l'aptamère anti-ATP [277] ou encore l'aptamère anti-coenzyme A [192] ont comme point commun d'être dirigés contre des cibles anioniques. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que les cations divalents jouent à la fois un rôle dans la stabilisation de la structure tertiaire de l'aptamère, mais aussi, comme l'évoquent Sazani et ses collaborateurs à propos de l'aptamère anti-ATP, dans la liaison cible/aptamère en permettant la mise en place d'interactions électrostatiques par pontage entre les charges négatives de l'aptamère et celles de la cible. En revanche, les aptamères dont l'affinité diminue avec la

concentration en cations divalents comme l'aptamère anti-cocaïne ou l'aptamère anti-citrulline [175] sont tous deux dirigés contre des cibles possédant une charge positive. Ici, les cations divalents sont nécessaires uniquement à la structure de l'aptamère. Les interactions électrostatiques entre l'aptamère chargé négativement et les charges positives de la cible sont probablement écrantées par les cations divalents en concentration trop importante, ce qui conduit à une diminution de l'affinité. Une baisse de la force ionique du tampon de sélection, en diminuant par exemple la concentration en NaCl, pourrait peut être permettre d'obtenir une meilleure affinité.

Même si la prévision de la composition optimale du tampon utilisé pour la rétention sur l'oligoadsorbant reste complexe, ce classement selon l'état de charge de la cible pourrait accélérer l'optimisation de la composition du tampon pour chaque nouvel aptamère étudié. Des études complémentaires de modélisation moléculaire ou de mesure d'affinités par électrophorèse capillaire.

VII. Conclusion

Bien que l'affinité de l'aptamère anti-cocaïne fasse partie des plus faibles (cf tableau 1), l'oligoadsorbant correspondant a tout de même montré un volume de fin de fixation suffisant pour son utilisation en extraction sur phase solide pour des échantillons de faibles volumes. Ainsi, la grande majorité des oligoadsorbants synthétisés avec des aptamères de meilleure affinité devrait montrer une meilleure rétention. La caractérisation de l'oligoadsorbant anti-OTA a quant à elle prouvé qu'il doit être possible de développer des procédures d'extraction entraînant une purification encore plus poussée sur les oligoadsorbants très rétentifs grâce à des conditions de lavage plus sévères.

En conclusion, l'utilisation d'agarose activée streptavidine et de sépharose activée CNBr ont conduit à des oligoadsorbants aux performances très proches. La facilité de synthèse des oligoadsorbants basés sur l'association biotine/streptavidine rend cette approche très intéressante. Cependant, la nature non covalente de la liaison formée pourrait constituer une limitation pour des oligoadsorbants exigeant des conditions d'élutions sévères. D'autre part, le facteur d'enrichissement obtenu sur ce type de support peut être limité devant les oligoadsorbants à immobilisation covalente. En effet, ceux-ci tolèrent des solutions plus éluantes qui permettent d'obtenir des fractions d'élution de volume inférieur. Ces observations ont conduit

au choix de la méthode d'immobilisation utilisant la sépharose activée CNBr, basée sur une immobilisation covalente des aptamères pour la suite de l'étude.

Chapitre 4 – Application des oligoadsorbants à des échantillons réels

Chapitre 4 – Application des oligoadsorbants à des échantillons réels

Dans le chapitre précédent, des procédures d'immobilisation d'aptamères sur des supports activés ont été développées, et les oligoadsorbants obtenus ont montré une forte rétention spécifique de leur cible. L'objectif de ce chapitre est d'étudier la sélectivité de ces supports en les appliquant à l'extraction des composés ciblés d'échantillons complexes. Ces oligoextractions, réalisées sur des supports synthétisés à partir de sepharose CNBr et avec un bras espaceur C6, seront comparées à d'autres méthodes de traitement de l'échantillon généralement utilisées pour les matrices complexes.

I. Oligoextraction de la cocaïne d'échantillons réels

A. Évaluation de la sélectivité du support

1. Particularités des aptamères constitués d'une jonction de trois tiges-boucles

La structure secondaire constituée de trois tiges-boucles de l'aptamère anti-cocaïne lui confère une spécificité particulière. En effet, lorsque trois brins ou trois régions d'ADN ou d'ARN s'assemblent pour former une structure à trois tiges, le site de jonction forme une cavité hydrophobe. La figure 63 présente un exemple de la structure de ce type de jonction.

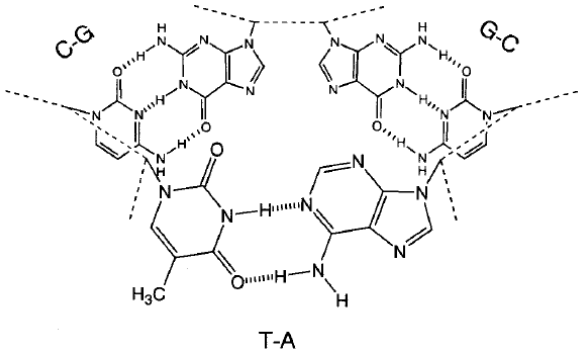
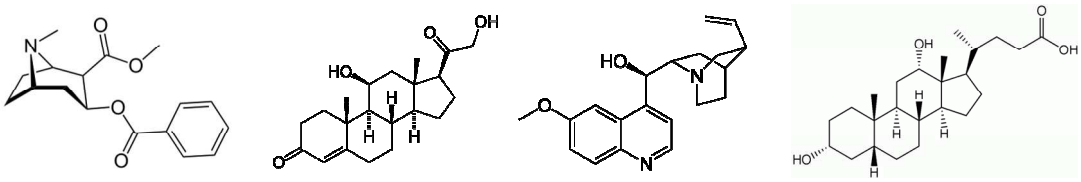


Figure 63 : Structure de la jonction de trois tiges boucles formée par deux paires G-C et une paire A-T. Les lignes pointillées symbolisent le squelette sucre-phosphate. Adapté de [278]

Cette région représente un site de fixation préférentiel pour de nombreuses molécules hydrophobes retenues par des interactions d'empilement [279]. Un aptamère sélectionné contre l'acide cholique possédant ce motif structural comme site de fixation de la cible a été identifié par Kato et ses collaborateurs [278]. Cet aptamère a montré un manque de spécificité puisqu'il reconnait six autres stéroïdes, les plus hydrophobes ayant la meilleure affinité. L'étude de la sélectivité de cet aptamère a conduit les auteurs à la conclusion que la fixation est principalement régie par des interactions hydrophobes. La discrimination entre les différents stéroïdes testés s'effectue selon leur taille et leur forme, et non par l'établissement d'interactions polaires spécifiques entre les groupements fonctionnels des stéroïdes et ceux de l'aptamère.

Un motif similaire de jonction de trois tiges boucles a été observé sur l'aptamère anti-cocaïne (cf Chap3.I.A.). Stojanovic et son équipe ont étudié la rétention sur l'aptamère anti-cocaïne de la quinine et de deux stéroïdes reconnus par l'aptamère anti-acide cholique, que sont la corticostérone et l'acide désoxycholique [279]. Cette étude a montré que la corticostérone et la quinine étaient reconnus par l'aptamère anti-cocaïne alors qu'en revanche, l'acide désoxycholique ne présentait aucune affinité. Les structures de ces molécules sont présentées en figure 64.



1) Cocaïne	2) Corticostérone	3) Quinine	4) Acide désoxycholique
Log P = 2,43 [2]	Log P = 1,43 [280]	Log P = 2,1 [281]	Log P = 3,5 [282]

Figure 64 : Structure des molécules reconnues (1-3) et non reconnue (4) par l'aptamère anti-cocaïne

Les différences structurales des trois molécules reconnues semblent montrer que les interactions mises en jeu dans la fixation de ces molécules sont

principalement de nature hydrophobe, et peu spécifiques, comme pour l'aptamère anti-acide cholique.

En effet, selon cette étude, les sites de fixation de ces deux aptamères sont très similaires, la faible différence de sélectivité des deux aptamères pourrait être due à la présence d'une paire de bases non complémentaires à proximité de la jonction de l'aptamère anti-cocaïne qui déforme le site de fixation.

Ce site de fixation, à la jonction de trois tiges boucles, confère donc à l'aptamère anti-cocaïne un manque de sélectivité. Cependant, l'étape d'oligoextraction étant placée en amont d'une séparation chromatographique, les éventuels composés co-extraits pourront être séparés et ainsi ne pas gêner la quantification de la cocaïne. De plus, si les résultats d'oligoextractions en milieux réels sont convaincants avec cet aptamère, tous les autres aptamères de plus grande spécificité ne pourront donner que de meilleures performances.

La rétention de la quinine sur l'oligoadsorbant anti-cocaïne a été étudiée. La procédure d'extraction précédemment développée a été appliquée à une solution de quinine à 250 ppb dans le tampon de sélection. La figure 65 présente le profil d'extraction obtenu.

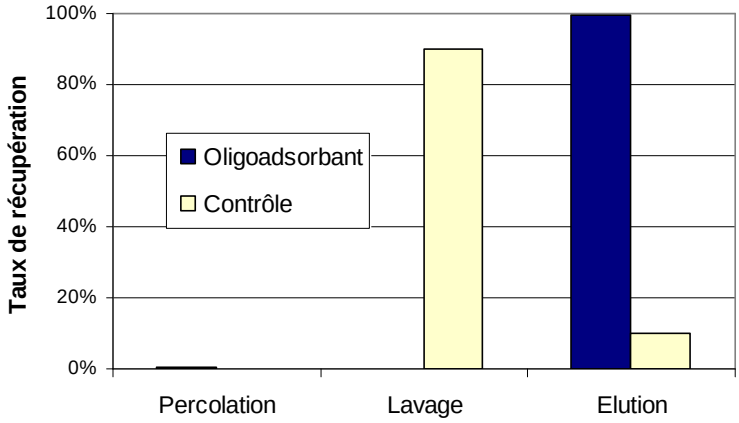


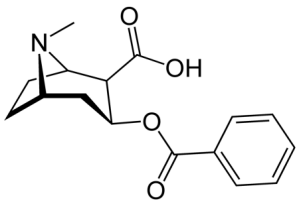
Figure 65 : Profil d'extraction de la quinine sur l'oligoadsorbant anti-cocaïne. Procédure identique à celle de la figure 42.

Le profil obtenu confirme le fait que la quinine soit reconnue par l'aptamère. En effet, un rendement d'extraction de 99 % a été obtenu pour cette molécule alors qu'il est de 86 % pour la cocaïne.

2. Reconnaissance des métabolites de la cocaïne

Cet aptamère anti-cocaïne étant relativement peu spécifique, il semblait plausible que les métabolites de la cocaïne, ayant une structure proche, soient

également reconnus. Ainsi, la rétention de la benzoylecgonine, métabolite principal de la cocaïne, qui diffère de cette molécule par la présence d'une fonction acide carboxylique à la place d'une fonction ester (cf Chap1.I.A.2), a été évaluée sur l'oligoadsorbant anti-cocaïne en appliquant la procédure précédemment développée. La structure de la benzoylecgonine ainsi que le profil d'extraction obtenu sont présentés en figure 66.



Benzoylecgonine

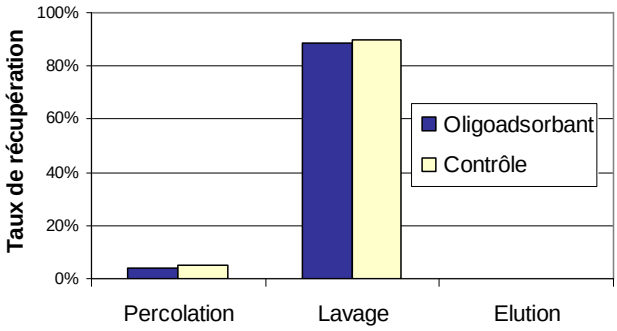


Figure 66 : Structure de la benzoylecgonine et profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant anti-cocaïne (pH=7,4). Procédure identique à celle de la figure 42.

Le profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant est identique à celui obtenu sur le support de contrôle. Cela signifie que l'aptamère anti-cocaïne ne possède aucune affinité pour la benzoylecgonine. Néanmoins, au pH du tampon de sélection (pH=7,4), la benzoylecgonine porte, contrairement à la cocaïne, une charge négative (pKa=3,15 [29]) qui pourrait expliquer cette différence d'affinité. Une seconde oligoextraction a donc été réalisée en pH acide de manière à placer la benzoylecgonine sous sa forme protonée. Une valeur de pH de 3 a été choisie comme compromis entre une forte proportion de benzoylecgonine protonée et l'absence d'hydrolyse acide de l'ADN. Le tampon de sélection a donc été ajusté à pH=3 pour réaliser cette extraction. Le profil obtenu est présenté en figure 67.

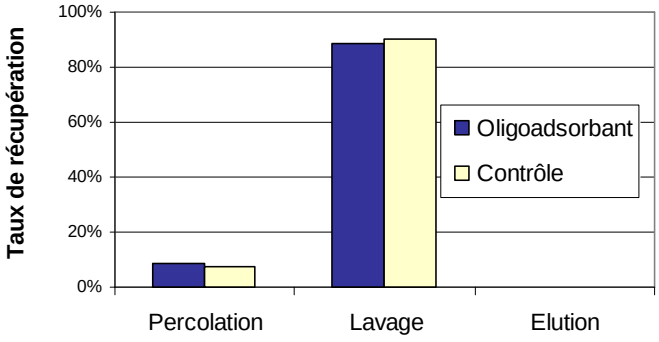


Figure 67 : Profil d'extraction obtenu en milieu acide (pH=3). Procédure identique à celle de la figure 42 excepté le pH du tampon de sélection qui a été ajusté à 3.

Le profil étant identique à pH=7,4 et à pH 3, on peut en conclure que la benzoylecgonine n'est pas reconnue par l'aptamère. La valeur de pKa de cette

molécule est trop faible pour pouvoir se placer à un pH qui annihile totalement l'effet de la charge négative.

D'autres études sur cet aptamère rapportent également ce comportement avec la benzoylecgonine [210] mais aussi avec l'ecgonine methyl ester [165,167,191,216], qui possède les mêmes propriétés acido-basiques que la cocaïne. La non reconnaissance de l'ecgonine methyl ester par l'aptamère pourrait s'expliquer par l'absence du groupement phényle présent sur la cocaïne, probablement indispensable pour établir des interactions hydrophobes d'empilement dans la cavité de fixation.

3. Conclusions

Le site de fixation de l'aptamère anti-cocaïne est relativement peu spécifique comparativement à d'autres aptamères ne possédant pas de jonction entre trois tiges boucles. Cependant, il a été utilisé avec succès dans de nombreux capteurs ou bioessais (cf Chap2.IV.B), même si certains auteurs ont mentionné que la présence de faux positifs était probable [283]. L'utilisation de cet aptamère permet donc de placer notre étude de faisabilité dans les conditions les moins favorables. Ainsi, tout oligoadsorbant synthétisé avec un aptamère plus spécifique conduira à une meilleure purification.

D'autre part, les métabolites de la cocaïne n'étant pas reconnus par l'aptamère, l'étude de la sélectivité de l'aptamère doit être réalisée dans une matrice biologique pour laquelle l'extraction et la quantification de la cocaïne est pertinente. Le sang a été choisi pour évaluer les performances de l'oligoextraction de la cocaïne d'un échantillon réel. En effet, cette matrice est la seule qui permette d'évaluer le degré d'influence de la drogue sur le comportement au moment du prélèvement (cf Chap1.I.A.3). Sa grande complexité nécessite le plus souvent un traitement de l'échantillon long et délicat. L'oligoextraction sera donc comparée aux méthodes généralement utilisées.

B. Extraction de la cocaïne de fluides biologiques

1. Oligoextraction de la cocaïne de plasma et comparaison à la SPE conventionnelle

Dans un premier temps, la sélectivité de l'oligoextraction a été évaluée en appliquant la procédure précédemment développée à un échantillon de plasma humain dopé par de la cocaïne à une concentration de 0,4 µg/mL. Cette valeur correspond à la concentration atteinte dans le sang après la prise d'une dose de cocaïne (45 mg en intraveineuse) [284]. Avant d'être appliqué à l'oligoadsorbant, le plasma a été dilué par un volume de tampon de sélection afin d'en diminuer la viscosité. La composition en cations du plasma étant très proche de celle du tampon de sélection ($[Na^+]$= 140 mM, $[K^+]$= 4,8 mM, $[Mg^{2+}]$= 0,8 mM, $[Ca^{2+}]$= 2,3 mM [285]), aucun ajustement de la composition du tampon de sélection n'est nécessaire. Le mélange est ensuite filtré avant d'être percolé (200 µL) sur l'oligoadsorbant à base de sépharose CNBr et synthétisé avec un espaceur C6.

Ce traitement par oligoextraction a été comparé à une extraction sur phase solide sur un support de silice greffée C18. La procédure d'extraction utilisée a été adaptée d'une étude de Maralikova et ses collaborateurs [94]. Cette procédure a été choisie car elle est représentative des traitements d'échantillons de plasmas réalisés pour des analyses de drogues. Une cartouche Isolute C18 (200 mg) est tout d'abord conditionnée par 2 mL de méthanol, 1mL d'eau ultra pure et 1 mL d'un tampon de bicarbonate d'ammonium (4mM, pH=9,4). Deux millilitres de ce même tampon sont ensuite ajoutés à 1 mL de plasma dopé par de la cocaïne à 0,4 µg/mL. Le mélange obtenu est percolé sur la cartouche, et est suivi d'une étape de lavage constituée d'un millilitre de tampon bicarbonate d'ammonium. L'étape d'élution est effectuée en percolant 1,5 mL de méthanol contenant 2% (V/V) d'acide acétique. Les extraits ainsi obtenus sont évaporés à sec sous flux d'azote, et repris dans huit millilitres de phase mobile analytique afin d'obtenir le même facteur de dilution que l'oligoextraction et de pouvoir comparer les chromatogrammes obtenus en termes d'efficacité de purification.

Les chromatogrammes issus de l'injection des fractions d'élution des deux méthodes d'extraction sont comparés en figure 68.

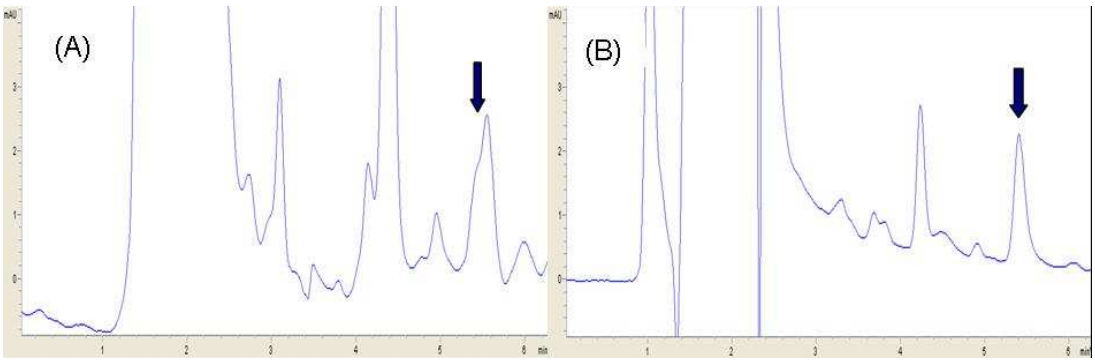


Figure 68 : Chromatogrammes obtenus lors de l'analyse des fractions d'élution d'une extraction par un support de silice C18 (A) et par l'oligoadsorbant (B). Le pic de la cocaïne est indiqué par la flèche.

Le rendement d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant est de 90 %, valeur relativement proche de celle obtenue en milieu pur (86 ± 10 %). La percolation d'un échantillon complexe ne perturbe donc pas la reconnaissance de la cocaïne par les aptamères.

D'autre part, le chromatogramme correspondant à l'oligoextraction présente un nombre plus réduit de composés co-extraits, ainsi qu'une ligne de base mieux définie que celui correspondant à l'extraction sur silice C18. De plus, l'utilisation du support non sélectif conduit à l'obtention d'un pic de cocaïne impur difficile à quantifier. Le composé interférent co-élué à la cocaïne, possédant une polarité similaire à celle-ci, sera co-extrait sur tout support dont la rétention est uniquement basée sur l'hydrophobie. La sélectivité des aptamères permet, en purifiant l'échantillon, d'éliminer ces coélutions chromatographiques responsables d'erreurs de quantification. Le chromatogramme résultant de l'oligoextraction révèle cependant la présence d'un composé co-extrait élué à 4,2 min. Ce composé pourrait être un stéroïde ou toute autre molécule hydrophobe présente dans le plasma et capable de se fixer au site de reconnaissance de l'aptamère anti-cocaïne. La courte séparation chromatographique utilisée est toutefois suffisante pour isoler la cocaïne et permettre sa quantification.

Bien que l'aptamère anti-cocaïne fasse partie des moins sélectifs, son utilisation pour l'oligoextraction a néanmoins conduit à une importante purification de l'échantillon, et démontre le grand potentiel que possèdent les aptamères pour leur utilisation en extraction sélective sur phase solide.

Après la percolation de plasma contenant des nucléases qui catalysent la dégradation de brins d'ADN, une extraction en milieu pur a été effectuée afin de vérifier l'intégrité de l'oligoadsorbant. Les rendements d'extraction avant et après l'application de l'échantillon de plasma ont été comparés. Un rendement d'extraction de 90 % ayant été obtenu, aucune perte de rétention n'a donc été notée.

Le temps de contact de ces enzymes avec les aptamères durant l'étape de percolation reste donc suffisamment court pour éviter la dégradation des aptamères. La stabilité des oligoadsorbants est donc suffisante pour le traitement d'échantillons biologiques.

La possibilité de réutiliser l'oligoadsorbant pour plusieurs extractions d'échantillons réels a également été étudiée. Pour cela, trois extractions de plasma consécutives ont été réalisées sur le même oligoadsorbant et une diminution progressive du rendement d'extraction a été observée : des valeurs de 72 %, 43 % et 41 % ont été obtenues. Pour s'assurer que cette baisse de rendement n'était due ni à une dégradation du support, ni à sa saturation progressive par des protéines retenues par interactions non spécifiques, une extraction en milieu pur a été effectuée et un rendement de 87 % a été obtenu, ce qui confirme l'intégrité de l'oligoadsorbant. Etant donné que le même échantillon de plasma dopé par de la cocaïne a été utilisé pour les trois extractions, cette baisse du rendement d'extraction peut être attribuée soit à une dégradation rapide de la cocaïne, bien que l'échantillon ait été conservé à 4°C, soit à une fixation progressive de la cocaïne aux protéines du plasma. En effet, ce phénomène de fixation de la cocaïne aux protéines a été rapporté dans plusieurs études [286-288] qui concluent que le pourcentage de cocaïne sous forme libre varie entre 5 et 70 % en fonction de la concentration. La forme liée de la cocaïne pourrait donc ne pas être reconnue par l'aptamère, et l'oligoadsorbant serait donc uniquement capable d'extraire la forme libre dont la proportion diminue progressivement après le dopage du plasma. Il est cependant important de noter que l'influence de ce phénomène n'a été évoquée dans aucune des études traitant de la conception de capteurs ou bioessais à partir d'aptamères anti-cocaïne et destinés à des échantillons biologiques.

Afin d'évaluer l'influence du phénomène de fixation aux protéines sur la reconnaissance des aptamères, deux oligoextractions, réalisées avant et après un traitement par précipitation des protéines d'un échantillon de plasma dans lequel de la cocaïne a été incubée, doivent être comparées. Une quantité de cocaïne supérieure retrouvée lors de la deuxième extraction signifiera que la fixation de la cocaïne aux protéines affecte sa reconnaissance par l'aptamère. A cet effet, une procédure de précipitation des protéines a été développée.

2. Développement de l'étape de précipitation des protéines

Diverses procédures de précipitation des protéines sont généralement utilisées pour le traitement d'échantillons de plasma [289-295]. Étant donné que

cette étape de précipitation des protéines sera placée en amont d'une oligoextraction, l'agent précipitant devra être choisi de manière à ce qu'il ne perturbe pas la rétention de la cocaïne par les aptamères.

La première procédure de précipitation des protéines testée consiste en l'ajout de sulfate de zinc et a été adaptée d'une étude de Romitelli et ses collaborateurs [293]. Un premier essai en milieu pur a été réalisé afin d'étudier l'influence des ions Zn^{2+} en forte concentration sur la rétention de la cocaïne par l'aptamère. Pour ce faire, 100 µL d'une solution du sulfate de zinc à 300 g/L ont été ajoutés à 1 mL de tampon de sélection dopé par de la cocaïne de sorte à se placer dans des conditions identiques à celles obtenues après l'étape de précipitation des protéines. Le traitement de 200 µL de ce mélange a conduit à un rendement d'extraction de 64 %. Ce résultat est donc cohérent avec l'étude de l'influence des cations divalents sur la rétention (Chap3.VI.B) qui concluait que l'augmentation de la concentration en cations divalents diminuait l'affinité de l'aptamère. Cette méthode s'avère donc inappropriée pour une utilisation en amont d'une oligoextraction avec l'aptamère anti-cocaïne.

La deuxième procédure testée consiste en la précipitation des protéines par l'acide trichloroacétique (TCA). Le protocole choisi a été adapté d'une étude de Polson et al [292]. Un volume d'une solution d'acide trichloroacétique à 10 % (m/V) est ajouté à deux volumes d'échantillon. Le pH du surnageant obtenu étant très acide (valeur théorique : pH=0,7), un volume d'un tampon ([$Tris_{base}$]=0,69 M, [KCl]=10,4 mM, [$MgCl_2$]=2,4 mM et [NaCl]=0,28 M. Calculs présentés en annexe 5) permettant d'ajuster le pH à une valeur de 7,4, ainsi que les concentrations en ions monovalents et divalents est ajouté juste avant la percolation sur l'oligoadsorbant. Ceci permet d'éviter l'hydrolyse acide des aptamères lors de la percolation de ce surnageant sur l'oligoadsorbant.

Une étude préalable concernant la dégradation de la cocaïne dans les conditions acides de cette étape de précipitation a été réalisée. De la cocaïne a été incubée pendant 28h à température ambiante en flacon ambré dans le tampon de sélection (pH=7,4) ou dans un mélange tampon de sélection/TCA 10 % (2:1, V/V) (pH=0,7). L'analyse chromatographique de ces deux solutions, après neutralisation de la solution acide, a montré que 26 % de la cocaïne initiale se sont dégradés dans le tampon de sélection, alors que seulement 4 % l'ont été dans la solution acide. Cela confirme que le principal mécanisme de la dégradation de la cocaïne est l'hydrolyse basique, et que cette molécules est stable en milieu très acide. Cette méthode de précipitation assure donc la non précipitation de la cocaïne durant cette étape.

Un premier essai a été réalisé en simulant le plasma par du tampon de sélection dopé afin de s'assurer que l'ajout de la solution de TCA puis du tampon neutralisateur n'affecte pas la rétention de la cocaïne sur l'oligoadsorbant. Pour cela, 200 µL d'une solution de TCA à 10 % ont été ajoutés à 400 µL de tampon de sélection dopé par de la cocaïne afin de simuler une étape de précipitation. 200 µL du tampon neutralisateur sont ensuite ajoutés avant de réaliser l'oligoextraction de 200 µL de la solution résultante. Le rendement d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant est de 93 %, ce qui prouve que cette méthode de précipitation des protéines est parfaitement compatible avec une oligoextraction.

Cette méthode de précipitation a ensuite été appliquée à un échantillon de plasma dopé par de la cocaïne (procédure présentée en annexe 6). Après une période d'incubation de quatre heures, cet échantillon de plasma dopé a été utilisé en parallèle pour une oligoextraction ainsi que pour une précipitation des protéines suivie d'une oligoextraction. Les quantités de cocaïne retrouvées par chacune des oligoextractions ont été comparées. Avec l'oligoextraction du plasma non traité par précipitation, 48 % de la cocaïne initialement introduite ont été retrouvés. Les 52 % manquants sont liés à la dégradation de la cocaïne pendant la période d'incubation et/ou à sa non reconnaissance par l'aptamère lorsqu'elle est fixée aux protéines. Pour l'oligoextraction du plasma traité par précipitation, seulement 28 % de la quantité de cocaïne initialement introduite ont été retrouvés. Puisque une quantité supérieure pour l'échantillon traité par précipitation était attendue, du fait de l'élimination des protéines responsable de la fixation de la cocaïne, la différence de quantité de cocaïne retrouvée ne peut être attribuée qu'à une co-précipitation de la cocaïne pendant l'étape de traitement par le TCA. Souverain et ses collaborateurs [295] rapportent également ce phénomène de co-précipitation avec cet agent précipitant sur des composés pharmaceutiques. Finalement, cette méthode de précipitation des protéines n'est donc pas appropriée à l'analyse quantitative de la cocaïne.

La troisième méthode de précipitation des protéines testée utilise l'acétonitrile comme agent précipitant selon une procédure adapté de Polson et al [292]. Les proportions utilisées dans cette procédure sont deux volumes d'acétonitrile pour un volume d'échantillon. Le principal inconvénient de cette méthode est que le surnageant obtenu est composé d'une forte proportion de solvant organique, ce qui rend impossible sa percolation directe sur un oligoadsorbant. Une étape d'évaporation à sec puis de reprise dans le tampon de sélection doit donc être ajoutée. La procédure suivie est détaillée en annexe 6. Les rendements obtenus par cette méthode sont généralement supérieurs à 80 % [292,295].

Une nouvelle fois, une oligoextraction directe d'un échantillon de plasma dopé par de la cocaïne et laissée incubée quatre heures a été comparée à une oligoextraction de ce plasma prétraité par une précipitation des protéines par l'acétonitrile. 64 % de la cocaïne introduite initialement ont été retrouvés par oligoextraction directe du plasma dopé, contre 65 % pour l'oligoextraction précédée de la précipitation des protéines. L'échantillon ayant été incubé pendant quatre heures à 4°C, il est donc probable que la quantité manquante soit due à une dégradation de la cocaïne (temps de demi-vie de la cocaïne dans le sang (37°C) : ~1h, cf Chap1.I.A.2). D'autre part, la répétabilité du rendement d'extraction ayant été démontrée précédemment, ce résultat laisse à penser que le rendement de l'étape de précipitation des protéines est proche des 100 %, et donc que la quantité de cocaïne extraite par l'oligoadsorbant est la même en présence et en l'absence des protéines du plasma. La fixation de la cocaïne aux protéines du plasma ne semble donc pas gêner sa reconnaissance par l'aptamère. Cette hypothèse demande toutefois à être vérifiée, notamment par l'analyse de tous les métabolites de la cocaïne afin de s'assurer que la quantité manquante provient uniquement de la dégradation de la cocaïne. Le fait que l'aptamère puisse extraire indifféremment la cocaïne libre ou liée pourrait s'expliquer par un déplacement de l'équilibre de la fixation de la cocaïne aux protéines vers sa libération lorsque la forme libre de la cocaïne se fixe aux aptamères

La baisse de la quantité de cocaïne observée lors des trois oligoextractions consécutives est donc due à sa dégradation très rapide dans le plasma, bien qu'il ait été conservé à 4°C et que le temps écoulé entre le dopage du plasma par la cocaïne et la troisième extraction n'ait pas excédé quatre heures.

3. Oligoextraction de sang total

Afin d'illustrer une nouvelle fois le fort potentiel que possèdent les oligoadsorbants pour l'extraction sélective d'analytes de matrices complexes, l'oligoextraction d'un échantillon de sang total a été réalisée et comparée au traitement par précipitation des protéines par l'acétonitrile décris précédemment et souvent utilisé pour ce type d'échantillon [292,295]. Les échantillons traités sont ensuite analysés par une méthode de chromatographie liquide de partage à polarité de phases inversées couplée à la spectrométrie de masse décrite en annexe 2. Les analyses sont réalisées en mode SIM, en suivant l'ion moléculaire de la cocaïne de rapport m/z = 304,1. Les échantillons de sang post-mortem ont été fournis par le

laboratoire de toxicologie ToxLab (Paris) et correspondent à des cas où le décès a été attribué à une overdose de cocaïne.

Étant donnée la grande complexité de ce type d'échantillons, la procédure d'oligoextraction précédemment développée a été légèrement modifiée pour permettre une meilleure purification. La très grande sensibilité de la spectrométrie de masse permet de diminuer le facteur d'enrichissement de l'oligoextraction en diminuant le volume percolé et en augmentant le volume de lavage, conduisant ainsi à une meilleure purification. Ainsi, les volumes de percolation et de lavage ont été respectivement fixés à 100 µL et 400 µL au lieu de 200 µL et 300 µL. La somme des volumes des étapes de percolation et de lavage étant restée constante, cette procédure doit conduire à un rendement d'extraction identique à celui obtenu précédemment.

Bien que le sang total et le tampon de sélection aient des compositions très proches en matière de pH, de force ionique et de concentration en calcium et magnésium, le sang a été dilué d'un facteur 4 par le tampon de sélection avant sa percolation sur l'oligoadsorbant. Le rôle de cette dilution est à la fois d'ajuster la composition de sang pour s'affranchir des légères variations que l'on peut rencontrer d'un lot à l'autre, et également d'en diminuer la viscosité afin de faciliter sa percolation sur l'oligoadsorbant.

Ainsi, pour l'oligoextraction directe de sang total, 25 µL de sang sont ajoutés à 75 µL de tampon de sélection et ce mélange est percolé à 4°C sur l'oligoadsorbant. Après une étape de lavage constituée de 400 µL de tampon de sélection, la cocaïne est éluée par 400 µL d'un mélange eau/acétonitrile 60/40 (V/V). Cette fraction d'élution est ensuite évaporée à sec sous flux d'azote, puis reprise dans 200 µL d'eau acidifiée (pH=4, HCl) pour limiter l'hydrolyse basique de la cocaïne avant son analyse.

Les quantités de cocaïne retrouvées par les deux méthodes de traitement de l'échantillon sont très proches, puisque la concentration dans le sang a été estimée à 26 ng/mL avec la méthode d'oligoextraction et à 28 ng/mL avec la méthode de précipitation des protéines. Les chromatogrammes obtenus en mode SIM en suivant le ratio m/z = 304,1 correspondants à ces deux méthodes sont présentés en figure 69.

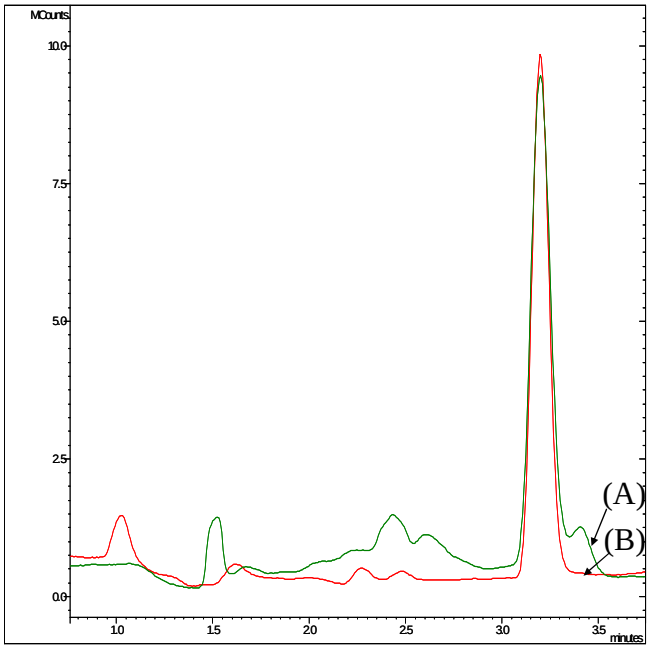


Figure 69 : Chromatogrammes correspondant à l'injection de sang post-mortem contenant de la cocaïne prétraité par une précipitation des protéines (A) ou une oligoextraction (B). Mode SIM. m/z = 304,1

Malgré la grande sélectivité du mode d'acquisition SIM, on remarque que la l'échantillon est si complexe que plusieurs composés possédant le même ratio m/z que la cocaïne sont présents. Cependant, la ligne de base est beaucoup mieux définie pour le chromatogramme provenant de l'injection du sang traité par oligoextraction, démontrant ainsi que cette méthode conduit à une meilleure purification. La limite de quantification obtenue pour cette méthode est de 0,7 ng/mL, valeur 2,4 fois plus faible qu'avec la précipitation des protéines. D'autre part, on observe qu'un composé interférent est co-élué avec la cocaïne sur le chromatogramme issu du traitement par précipitation des protéines. Ce composé perturbe donc la quantification de la cocaïne et pourrait être à l'origine de la légère différence de concentration obtenues par les deux méthodes de traitement. Pour le chromatogramme issu du traitement par oligoextraction, aucune co-élution n'est observée grâce à la purification apportée par la sélectivité des aptamères. Dans ce cas précis, une détection en mode MRM permettrait l'élimination du pic interférent sur le chromatogramme issu du traitement par précipitation des protéines. Néanmoins, les propriétés de purification des oligoadsorbants pourraient être précieuses en cas d'effets de matrices au cours de l'étape d'ionisation, ceux-ci affectant sans distinction les modes SIM ou MRM pour une analyse quantitative.

Ces résultats, pourtant obtenus avec un aptamère relativement peu spécifique et ayant une faible affinité, sont donc prometteurs pour l'utilisation des oligoadsorbants pour l'extraction sélective de composés d'échantillons complexes.

II. Oligoextraction de l'ochratoxine A du vin

Les oligoadsorbants anti-OTA ont également été appliqués à des échantillons réels, afin de confirmer leur potentiel pour l'extraction sélective de l'OTA en milieu complexe.

A. Oligoadsorbant à base d'agarose activée streptavidine

La possibilité d'extraire l'OTA d'échantillons de vin sur l'oligoadsorbant synthétisé à partir d'agarose activée streptavidine a été étudiée. Ce support étant basé sur un mode de greffage non covalent, une étude préliminaire sur sa stabilité suite à la percolation d'un échantillon contenant 10 % d'éthanol a été réalisée. Ainsi, une solution dopée par de l'OTA et constituée d'un mélange tampon de fixation/éthanol 90/10 (V/V) a été extraite en appliquant la procédure précédemment développée sur cet oligoadsorbant. Un rendement d'extraction de 100 % a été obtenu pour une quantité d'OTA percolée correspondant à 0,4 % de la valeur de capacité précédemment mesurée.

Afin de déceler une éventuelle baisse de la capacité, liée à une dégradation du support par l'éthanol, une extraction en milieu aqueux pur d'une quantité plus importante d'OTA, représentant 65 % de la capacité précédemment déterminée, est effectuée. Un rendement d'extraction de 85 % a été obtenu, ce qui met en évidence une baisse significative de la capacité. D'autres extractions en milieu pur d'importantes quantités d'OTA ont alors été réalisées afin d'estimer plus précisément la nouvelle valeur de capacité. La figure 70 présente la nouvelle courbe de capacité issue de ces valeurs.

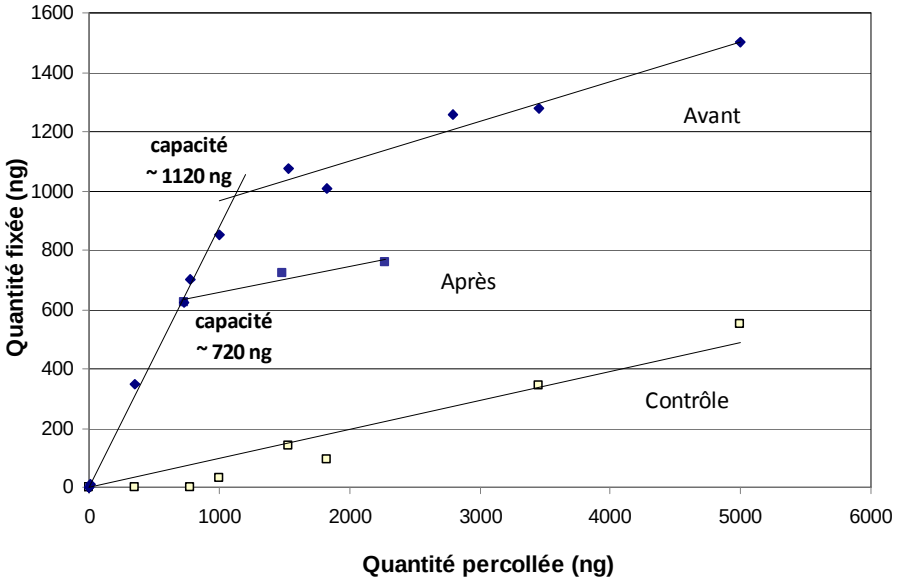


Figure 70 : Courbes de capacités de l'oligoadsorbant à base d'agarose activée streptavidine avant et après le passage de l'échantillon contenant 10 % d'éthanol.

La nouvelle valeur de capacité déduite des extractions en milieu aqueux, effectuées après le passage de l'échantillon contenant 10 % d'éthanol, est évaluée à 720 ng, contre 1120 ng initialement. Ceci correspond à une diminution de capacité de 36 %.

La liaison biotine/streptavidine est donc trop sensible à la présence des 10 % d'éthanol pour permettre la percolation de vin sur ce support. L'oligoadsorbant basé sur un greffage covalent doit être utilisé pour ce type d'application.

B. Oligoextraction de vin sur le support à base de sepharose CNBr

1. Comparaison de l'oligoextraction à l'injection directe de vin

L'oligoadsorbant synthétisé à partir de sepharose CNBr a été utilisé pour réaliser une extraction de l'OTA de vin rouge en appliquant le protocole précédemment développé en milieu pur (cf Chap3.IV.B.2). Le vin est dopé par de l'OTA à 2 µg/L, ce qui correspond à la valeur maximale autorisée (cf Chap1.I.B.2). L'échantillon de vin, d'un pH voisin de 3, est préalablement ajusté à pH=8,5, valeur identique à celle du tampon de fixation, avant d'être percolé sur l'oligoadsorbant. La fraction d'élution est analysée et comparée avec l'injection directe de vin dopé. Les deux chromatogrammes obtenus sont présentés en figure 71.

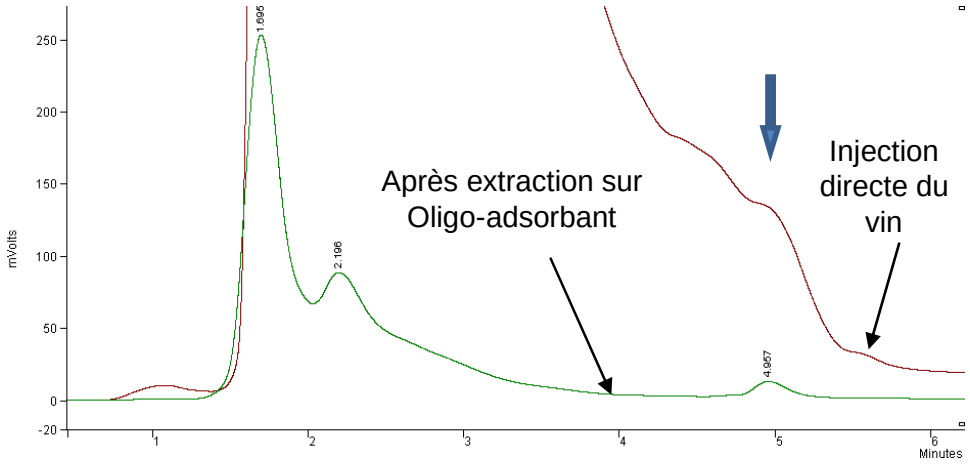


Figure 71 : Chromatogrammes correspondant à l'injection de vin dopé par de l'OTA (2 µg/L) non traité et traité par l'oligoadsorbant. Le temps de rétention de l'OTA est indiqué par la flèche.

La comparaison de ces deux chromatogrammes permet de mettre en avant la purification apportée par l'oligoextraction. En effet, bien que la détection fluorimétrique soit relativement spécifique, le chromatogramme issu de l'injection directe de vin contient un très grand nombre de composés interférents qui empêchent son interprétation. L'oligoextraction a conduit à l'élimination de la quasi totalité de ces composés interférents. Cependant, un rendement d'extraction de 136 % a été obtenu lors de l'intégration du pic d'OTA obtenu sur le chromatogramme issu du traitement par l'oligoadsorbant. La présence d'un épaulement sur le pic de l'OTA (cf figure 73) indique que ce rendement anormalement élevé est synonyme de pic impur. Afin de confirmer la présence d'une impureté, une extraction d'un échantillon de vin non dopé a été effectuée. Le chromatogramme obtenu est présenté en figure 72.

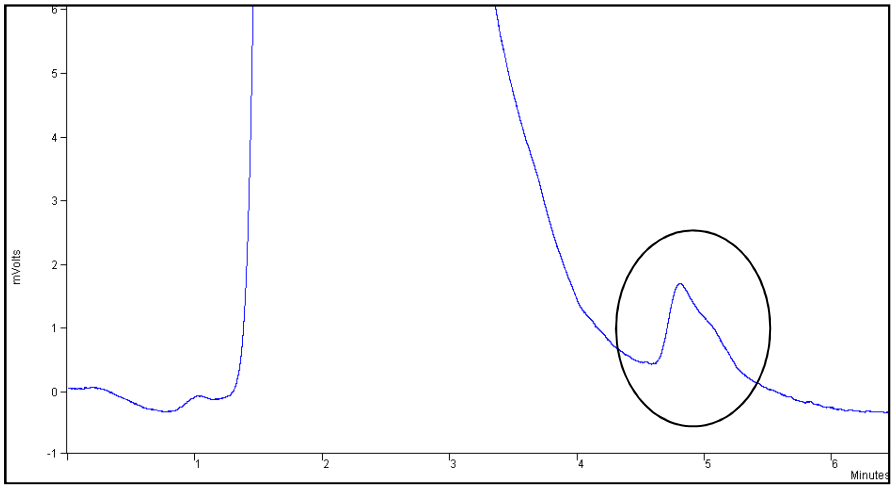


Figure 72 : Chromatogramme correspondant à l'injection d'un échantillon de vin non dopé par de l'OTA et préalablement extrait par l'oligoadsorbant

Ce chromatogramme confirme la présence d'un ou plusieurs composés à un temps de rétention voisin de celui de l'OTA. Etant donnée la très grande rétention de l'OTA sur l'oligoadsorbant, la procédure d'extraction a ensuite été optimisée de sorte à éliminer ces composés co-extraits.

2. Optimisation de la procédure d'extraction

Afin d'éliminer le ou les composés interférents co-élués avec l'OTA, le volume et la force éluante de la fraction de lavage peuvent être augmentées. Un protocole comportant une fraction de lavage constituée de 2 mL d'un mélange tampon de fixation/acétonitrile 80/20 (V/V), contre 1 mL de tampon de fixation/acétonitrile 90/10 (V/V) précédemment, a été testé en milieu pur. Un rendement de 100 % a été obtenu pour cette extraction. La rétention de l'OTA sur l'oligoadsorbant est donc suffisamment forte pour permettre l'utilisation de 20 % d'acétonitrile dans la fraction de lavage. Dans le but d'obtenir une étape de lavage la plus efficace possible, le volume de cette fraction de lavage a été augmenté à 3 mL. Le rendement d'extraction obtenu en milieu pur en appliquant cette procédure est de 96 %. Ce choix semble être un bon compromis entre un lavage efficace et un rendement d'extraction élevé.

Ce protocole optimisé a ensuite été appliqué à un échantillon de vin dopé. La figure 73 compare les chromatogrammes obtenus avant et après optimisation de la procédure d'extraction.

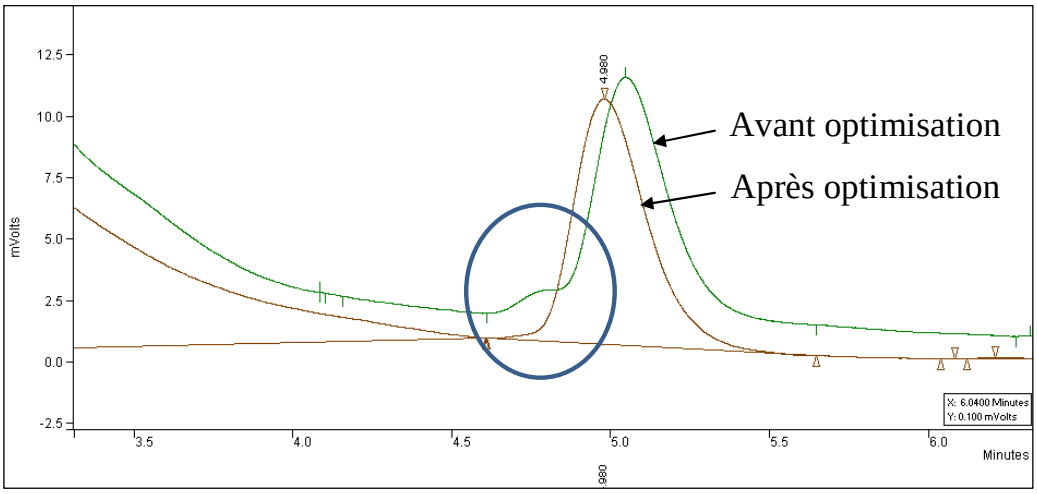


Figure 73 : Chromatogrammes issus de l'injection de vin dopé prétraité par oligoextraction non optimisée et optimisée.

On remarque que l'épaulement observé sur le chromatogramme correspondant à l'oligoextraction non optimisée est absent suite à l'application de la procédure optimisée. L'application de conditions de lavage plus efficaces a donc

permis l'élimination des composés interférents, conduisant à l'obtention d'un pic pur, donc d'une quantification plus fiable. Un rendement d'extraction de 93 % a été obtenu, ce qui confirme que les composés responsables de la surestimation précédemment observée ont été éliminés.

3. Comparaison à un support conventionnel et à un immunoadsorbant

Les performances de l'oligoadsorbant ont été comparées à celles d'un support SPE conventionnel (Silice C18) et d'un autre support sélectif, un immunoadsorbant, constitué d'anticorps anti-OTA immobilisés sur un support solide. Les procédures appliquées pour chaque support ont été adaptées de protocoles extraits d'un article de Hernandez et al pour le support de silice C18 [95], et d'une résolution de l'office international de la vigne et du vin [165] pour l'immunoadsorbant. Ces procédures ont été adaptées de telle sorte que l'analyse de la fraction d'élution corresponde à la même quantité de vin extraite dans les trois cas. La procédure d'immunoextraction est composée de la percolation du vin dopé dilué par un volume de tampon bicarbonate, d'un premier lavage par du tampon bicarbonate, d'un second lavage par de l'eau, et d'une élution par du méthanol. Concernant le support de silice C18, l'échantillon de vin dopé est dilué dans un volume d'eau avant d'être percolé, un premier lavage par de l'eau est ensuite appliqué et suivi par un second lavage par une solution eau/méthanol 40/60 (V/V). L'élution est ensuite réalisée par du méthanol. Les protocoles d'extraction détaillés sont décrits en annexe 7. Les chromatogrammes issus des prétraitements par l'oligoadsorbant, la silice C18 et l'immunoadsorbant sont présentées en figure 74.

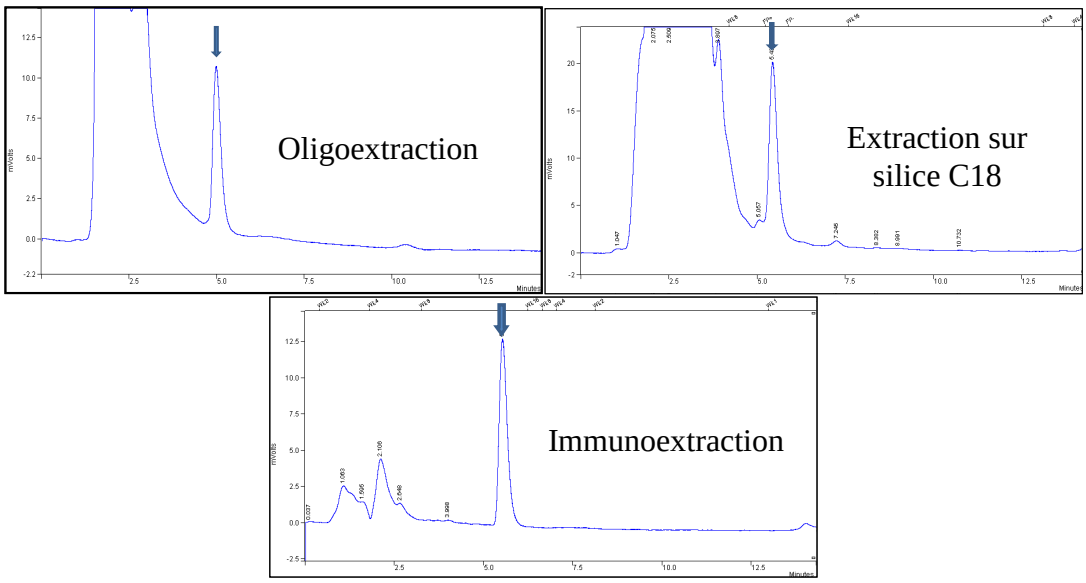


Figure 74 : Chromatogrammes correspondant à l'extraction de l'OTA dans le vin par un oligoadsorbant, un support de silice greffée C18 et un immunoadsorbant. Vin dopé à 2 µg/L. Procédures décrites en annexe 7

Le chromatogramme issu du prétraitement par la silice C18 montre que ce support est celui qui engendre le plus de co-extractions. La présence d'un épaulement sur le pic de l'OTA indique que ce pic est impur. Le rendement obtenu (122 %) confirme qu'un ou plusieurs composés interférents est/sont sont co-élué(s) avec l'OTA, ce qui entraîne une surestimation de sa concentration. Comme évoqué précédemment, ce type de support basé uniquement sur l'établissement d'interactions hydrophobes peut entraîner la co-extraction de composés de polarité voisine de celle de l'analyte, provoquant des coélutions lors de la séparation.

Concernant les deux supports d'extraction basés sur des mécanismes de reconnaissance moléculaire, les chromatogrammes issus de ces prétraitements présentent un pic d'OTA sans épaulement, permettant ainsi une quantification aisée et fiable. Cependant, on remarque que l'oligoadsorbant engendre la co-extraction d'un nombre plus importants de composés polaires, dont le temps de rétention est proche du temps mort de la colonne analytique. Ceci pourrait être dû à la forte densité de charge que présentent les aptamères par rapport aux anticorps. Ces charges peuvent être à l'origine d'interactions polaires non spécifiques développées avec ces molécules, les conditions de lavages employées, choisies pour éluer les substances plus apolaires, ne provoquant pas leur rupture. La procédure d'oligoextraction pourrait donc être améliorée en décomposant l'étape de lavage en plusieurs phases. Un premier lavage, constitué d'un volume important d'une solution aqueuse de force ionique élevée, permettrait tout d'abord l'élimination des composés polaires sans nuire à la rétention de l'OTA. Un second lavage par une solution de volume plus réduit et composée d'environ 30 % de solvant organique,

permettrait l'élution des composés apolaires. Ces travaux ayant été effectués en fin de thèse, ce type de protocole n'a pas pu être évalué.

III. Conclusion

L'utilisation de l'aptamère anti-cocaïne pour cette étude de faisabilité a permis de montrer le fort potentiel de l'oligoextraction, malgré l'affinité et la sélectivité limitée de l'aptamère. Bien que la rétention de la cocaïne sur ce support ne permette pas d'obtenir un facteur d'enrichissement élevé pour l'extraction de la cocaïne, cette technique d'extraction apporte une grande sélectivité à l'étape d'extraction par rapport aux autres techniques généralement utilisées, augmentant ainsi la fiabilité des résultats.

La synthèse d'un second oligoadsorbant, avec un aptamère possédant une affinité plus forte, a permis le développement d'une procédure d'oligoextraction plus performante en termes de concentration. Son application à une matrice très complexe et en association avec une détection moins spécifique que pour la cocaïne, a montré des performances de purification comparables aux immunoadsorbants. Une autre matrice telle que le blé pourrait être testée afin de confirmer que les oligoadsorbants constituent une réelle alternative aux immunoadsorbants.

Il est également à noter que le développement des protocoles d'extraction des échantillons réels est très rapide, contrairement aux polymères à empreintes moléculaires, qui nécessitent souvent une longue optimisation notamment des étapes de lavage.

Conclusion

L'aptamère anti-cocaïne a été choisi comme aptamère modèle afin de concevoir un support d'extraction sélective sur phase solide. La première étape de cette étude de faisabilité a concerné l'immobilisation des aptamères. De nombreux protocoles différents sont décrits dans la littérature, mais le plus populaire, consistant à fixer des aptamères biotinylés à un support activé streptavidine, s'est avéré très simple à mettre en œuvre et a conduit à des oligoadsorbants très rétentifs. Cependant, son principal inconvénient réside dans la nature non covalente de la liaison formée, qui offre une moins grande flexibilité dans le choix des conditions d'élution du fait de sa fragilité.

L'oligoadsorbant basé sur l'immobilisation covalente d'aptamères amino-modifiés sur de la sepharose activée CNBr a montré des performances relativement proches de celles obtenues sur l'oligoadsorbant biotine/streptavidine. L'influence de la longueur du bras espaceur sur le greffage et sur la rétention a été étudiée pour ce type de greffage. Lorsque la longueur du bras espaceur est augmentée, le nombre d'aptamères greffés augmente mais le pourcentage d'aptamères greffés et actifs diminue, ces deux composantes se compensent et les supports obtenus possèdent, au final, des rétentions et des capacités très proches. Les forts taux de greffages obtenus avec l'espaceur C12 suggèrent qu'une optimisation des conditions de greffage visant à augmenter le pourcentage d'aptamères actifs greffés serait à envisager. Il serait également intéressant de mettre au point un greffage sur un support résistant à la pression afin de réaliser des oligoextractions couplées en ligne avec l'analyse chromatographique.

La sélectivité de l'oligoadsorbant développé a ensuite été validée par l'extraction de cocaïne de plasma humain et de sang post-mortem. Les chromatogrammes correspondant à l'injection des échantillons extraits par oligoextraction ont montré un apport important en purification comparé aux techniques généralement employées.

Ce développement a ensuite été transposé à un second aptamère, avec lequel des oligoadsorbants ont été synthétisés et caractérisés de la même façon. La plus faible constante de dissociation de cet aptamère a conduit à un volume de fin de fixation plus de dix fois supérieur à celui de l'oligoadsorbant anti-cocaïne. Le protocole de greffage ainsi que les compositions des solutions utilisées durant la procédure d'extraction se sont avérées directement transposables de l'oligoadsorbant

anti-cocaïne à l'oligoadsorbant anti-OTA. Ceci laisse donc présager que ces développements sont généralisables à tout autre aptamère. Seuls les volumes des différentes fractions et la composition du tampon utilisé pour la percolation et le lavage ont dû être optimisés. L'application de ce support à l'extraction de l'OTA à partir d'un vin rouge a montré des résultats comparables à ceux des immunoadsorbants, très fréquemment utilisés.

Le point faible des supports d'extraction sélective sur phase solide est que le nombre de composés qu'il est possible d'extraire simultanément est relativement réduit. Sur ce point, les oligoadsorbants offrent des propriétés très intéressantes comparées aux autres systèmes de reconnaissance moléculaire. En effet, les progrès du procédé SELEX permettront très probablement de sélectionner des aptamères dont la réactivité croisée sera prédéfinie, ce qui est impossible pour les anticorps ou les MIP. Par exemple, la sélection d'un aptamère capable de reconnaitre de manière spécifique la cocaïne, la benzoylecgonine et l'ecgonine methyl ester constituerait un outil très puissant pour la synthèse d'un oligoadsorbant destiné à une analyse ciblée de cette famille de molécules, permettant ainsi d'augmenter grandement la sensibilité de la méthode. Il est également envisageable de sélectionner des aptamères très spécifiques, sélectionnés pour reconnaître une seule molécule, afin de développer des méthodes d'analyse sur site constituées d'une étape d'oligoextraction directement couplée à la détection, sans séparation chromatographique. Le format devra cependant être adapté à ces méthodes de terrain en miniaturisant le dispositif, afin d'en augmenter la portabilité et d'en réduire le coût.

Références bibliographiques

[1] P. Jatlow, *The Yale journal of Biology and Medicine* 61 (1988) 105.

[2] A. Maquille, D. Guillarme, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, *Chromatographia* 70 (2009) 8.

[3] http://www.atforum.com/SiteRoot/images/GIFS/pg6.gif, consulté en 2010

[4] A. Warner, A.B. Norman, *Therapeutic Drug Monitoring* 22 (2000) 266.

[5] S. Castiglioni, E. Zuccato, C. Chiabrando, R. Fanelli, R. Bagnati, *Mass Spectrometry Reviews* 27 (2008) 378.

[6] R.A. Jufer, W.D. Darwin, E.J. Cone, J.B. Maciej, in Handbook of Analytical Separations, Elsevier Science B.V., 2000, p. 67.

[7] B.D. Paul, S. Lalani, T. Bosy, A.J. Jacobs, M.A. Huestis, *Biomedical Chromatography* 19 (2005) 677.

[8] A.G. Verstraete, *Ann Toxicol Anal* 14 (2002) 390.

[9] G. Pépin, G. Duffort, N. Rommel, P. Kintz, V. Dumestre-Toulet, M.-F. Kergueris, G. Lachatre, M. Moulsma, J.-P. Goullé, C. Lacroix, I. Ricoordel, P. Mura, F. Vincent, A. Gruson, A. Gruson, M. Lhermitte, B. Capolaghi, A. Turcant, M.-H. Ghysel, P. Corteel, *Ann Toxicol Anal* 15 (2003) 108.

[10] V. Dumestre-Toulet, *Ann Toxicol Anal.* 14 (2002) 43.

[11] P. López, S. Martello, A. Bermejo, E. De Vincenzi, M. Tabernero, M. Chiarotti, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 1539.

[12] Kintz, Pascal, Villain, Marion, Cirimele, Vincent, *Spectra analyse* 35 (2005) 4.

[13] C. Ragoucy-Sengler, *Revue Française des Laboratoires* 2000 (2000) 35.

[14] N. Samyn, V. Areschka, P. Kintz, *Ann Toxicol Anal.* 14 (2002) 33.

[15] M.A. Huestis, J.M. Oyler, E.J. Cone, A.T. Wstadik, D. Schoendorfer, R.E. Joseph, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 733 (1999) 247.

[16] Y. Xia, Wang, M.G. Bartlett, H.M. Solomon, K.L. Busch, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 764.

[17] S. Valente-Campos, M. Yonamine, R.L.d.M. Moreau, O.A. Silva, *Forensic Science International* 159 (2006) 218.

[18] P. Fernández, M. Aldonza, A. Bouzas, M. Lema, A.M. Bermejo, M.J. Tabernero, *Journal of Applied Toxicology* 26 (2006) 253.

[19] J. Bones, K.V. Thomas, B. Paull, *Journal of Environmental Monitoring* 9 (2007) 701.

[20] S.D. Richardson, *Analytical Chemistry* 81 (2009) 4645.

[21] E. Zuccato, C. Chiabrando, S. Castiglioni, D. Calamari, R. Bagnati, S. Schiarea, R. Fanelli, *Environmental Health: A Global Access Science Source* 4 (2005) 14.

[22] B.R. Brunet, A.J. Barnes, K.B. Scheidweiler, P. Mura, M.A. Huestis, *Analytical and bioanalytical chemistry* 392 (2008) 115.

[23] D.M.J. Follador, M. Yonamine, R.L.D.M. Moreau, O.A. Silva, *Journal of Chromatography B* 811 (2004) 37.

[24] K. Lachenmeier, F. Musshoff, B. Madea, *Forensic Science International* 159 (2006) 189.
[25] L. Virag, S. Jamdar, C.R. Chao, H.O. Morishima, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 658 (1994) 135.
[26] M.R. Brunetto, Y.D. Cayama, L.G. García, M. Gallignani, M.A. Obando, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37 (2005) 115.
[27] P. Fernandez, M. Leon, A.M. Bouzas, A.M. Bermejo, M.J. Tabernero, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 26 (2003) 2003
[28] P. Fernández, L. Morales, C. Vázquez, A.M. Bermejo, M.J. Tabernero, *Forensic Science International* 161 (2006) 31.
[29] C. Foulon, M.-C. Menet, N. Manuel, C. Pham-Huy, H. Galons, J.-R. Claude, F. Guyon, *Chromatographia* 50 (1999) 721.
[30] P. Jatlow, H. Nadim, *Clin Chem* 36 (1990) 1436.
[31] F. Ma, J. Zhang, C.E. Lau, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 693 (1997) 307.
[32] W.-j. Pan, M.A. Hedaya, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 703 (1997) 129.
[33] P.R. Puopolo, P. Chamberlin, J.G. Flood, *Clin Chem* 38 (1992) 1838.
[34] H.Z. Rofael, M.S. Abdel-Rahman, *Journal of Applied Toxicology* 22 (2002) 123.
[35] L. Virag, B. Mets, S. Jamdar, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 681 (1996) 263.
[36] L. Sun, G. Hall, C.E. Lau, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 745 (2000).
[37] F. Tagliaro, C. Antonioli, Z. De Battisti, S. Ghielmi, M. Marigo, *Journal of Chromatography A* 674 (1994) 207.
[38] N.F. Bouzas, S. Dresen, B. Munz, W. Weinmann, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395 (2009) 2499.
[39] E. Jagerdeo, M.A. Montgomery, M.A. LeBeau, M. Sibum, *Journal of Chromatography B* 874 (2008) 15.
[40] S.S. Johansen, H.M. Bhatia, *Journal of Chromatography B* 852 (2007) 338.
[41] M. Bjørk, M. Nielsen, L. Markussen, H. Klinke, K. Linnet, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396 (2010) 2393.
[42] C. Moore, C. Coulter, K. Crompton, *Journal of Chromatography B* 859 (2007) 208.
[43] http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/WADA_TD2003IDCR_FR.pdf, consulté en 2010
[44] P. Marquet, *Annales de Toxicologie Analytique* XVII (2005) 5.
[45] F. Badoud, E. Grata, L. Perrenoud, L. Avois, M. Saugy, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 4423.
[46] T. Berg, E. Lundanes, A.S. Christophersen, D.H. Strand, *Journal of Chromatography B* 877 (2009) 421.
[47] N. Dubois, B. Debrus, C. Charlier, *Acta Clinica Belgica* 65 (2010) 75.
[48] M.K.K. Nielsen, S.S. Johansen, P.W. Dalsgaard, K. Linnet, *Forensic Science International* 196 (2010) 85.
[49] J.-O. Thörngren, F. Östervall, M. Garle, *Journal of Mass Spectrometry* 43 (2008) 980.
[50] B. Kabak, *Food and Chemical Toxicology* 47 (2009) 348.

[51] C. Zaied, S. Abid, L. Zorgui, C. Bouaziz, S. Chouchane, M. Jomaa, H. Bacha, *Food Control* 20 (2009) 218.
[52] D. Flajs, A.M. Domijan, D. Ivic, B. Cvjetkovic, M. Peraica, *Food Control* 20 (2009) 590.
[53] G.J. Soleas, J. Yan, D.M. Goldberg, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001) 2733.
[54] A. Napolitano, V. Fogliano, A. Tafuri, A. Ritieni, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007) 10499.
[55] N.E. Ahmed, M.M. Farag, K.M. Soliman, A.K.M. Abdel-Samed, K.M. Naguib, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007) 9576.
[56] A. Pittet, D. Tornare, A. Huggett, R. Viani, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1996) 3564.
[57] J. Serra Bonvehi, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004) 6347.
[58] A. Pfohl-Leszkowicz, R.A. Manderville, *Molecular Nutrition & Food Research* 51 (2007) 1192.
[59] http://intro.bio.umb.edu/111-112/OLLM/111F98/newclogp.html, consulté en 2010
[60] A. Pfohl-Leszkowicz, A. Molinié, M. Castegnaro, *Revista Mexicana de Micología* 19 (2004) 7.
[61] M. Skaug, W. Eduard, F. Størmer, *Mycopathologia* 151 (2001) 93.
[62] I. Iavicoli, C. Brera, G. Carelli, R. Caputi, A. Marinaccio, M. Miraglia, *International Archives of Occupational and Environmental Health* 75 (2002) 381.
[63] A.S. Halstensen, K.-C. Nordby, O. Elen, W. Eduard, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 11 (2004) 245.
[64] K. Muñoz, M. Vega, G. Rios, S. Muñoz, R. Madariaga, *Food and Chemical Toxicology* 44 (2006) 1884.
[65] P. Mosesso, S. Cinelli, J. PinÌƒero, R. Bellacima, G. Pepe, *Chemical Research in Toxicology* 21 (2008) 1235.
[66] M. Pascale, A. Visconti, *Mycopathologia* 152 (2001) 91.
[67] H. Valenta, *Journal of Chromatography A* 815 (1998) 75.
[68] N.W. Turner, S. Subrahmanyam, S.A. Piletsky, *Analytica Chimica Acta* 632 (2009) 168.
[69] C. Brera, J.M. Soriano, F. Debegnach, M. Miraglia, *Microchemical Journal* 79 (2005) 109.
[70] F. KarbancIoglu-Güler, D. Heperkan, *Analytica Chimica Acta* 617 (2008) 32.
[71] M.T. Nguyen, M. Tozlovanu, T.L. Tran, A. Pfohl-Leszkowicz, *Food Chemistry* 105 (2007) 42.
[72] I. Studer-Rohr, D.R. Dietrich, J. Schlatter, C. Schlatter, *Food and Chemical Toxicology* 33 (1995) 341.
[73] M. Peraica, A.-M. Domijan, R. Fuchs, A. Lucic, B. Radic, *Toxicology Letters* 110 (1999) 105.
[74] A.G. Frenich, J.L.M. Vidal, R. Romero-González, M.d.M. Aguilera-Luiz, *Food Chemistry* 117 (2009) 705.
[75] A. Bacaloni, C. Cavaliere, A. Faberi, E. Pastorini, R. Samperi, A. Lagana, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 5518.
[76] I.Y. Goryacheva, S. De Saeger, M. Lobeau, S.A. Eremin, I. Barna-Vetró, C. Van Peteghem, *Analytica Chimica Acta* 577 (2006) 38.

[77] A.M. Timperio, P. Magro, G. Chilosi, L. Zolla, *Journal of Chromatography B* 832 (2006) 127.
[78] M. Ventura, D. Guillén, I. Anaya, F. Broto-Puig, J.L. Lliberia, M. Agut, L. Comellas, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20 (2006) 3199.
[79] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 3929.
[80] P.J. Taylor, *Clinical Biochemistry* 38 (2005) 328.
[81] Gilson, *The Gilson Guide for SPE automation*.
[82] V. Pichon, *Techniques de l'ingénieur* P1420 (2006).
[83] C.F. Poole, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22 (2003) 362.
[84] R.E. Majors, *LCGC Europe* December (2001).
[85] http://static.coleparmer.com/small_images/1093700.jpg, consulté en 2010
[86] http://www.restek.com/restek/images/standard/26207_ph_so_spe.jpg, consulté en 2010
[87] E.M. Thurman, K. Snavely, *trends in analytical chemistry* 19 (2000) 18.
[88] http://www.sigmaaldrich.com/prodimages/p/p000100.jpg, consulté en 2010
[89] http://www.waters.com/webassets/other/catalogimages/sepplates.jpg, consulté en 2010
[90] M.-C. Hennion, *Journal of Chromatography, A* 856 (1999) 3.
[91] S. Rodriguez-Mozaz, M.J.L.d. Alda, D. Barceló, *Journal of Chromatography, A* 1152 (2007) 97.
[92] S. Wille, W. Lambert, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007) 1381.
[93] R.E. Majors, *LCGC Europe* (2003).
[94] B. Maralikova, W. Weinmann, *Journal of Chromatography, B* 811 (2004) 21.
[95] L. Bijlsma, J.V. Sancho, E. Pitarch, M. Ibáñez, F. Hernández, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 3078.
[96] A.W. Jones, A. Holmgren, F.C. Kugelberg, *Forensic science international* 177 (2008) 133.
[97] R. Kronstrand, R. Grundin, J. Jonsson, *Forensic Science International* 92 (1998) 29.
[98] W.M.A. Niessen, P. Manini, R. Andreoli, *Mass Spectrometry Reviews* 25 (2006) 881.
[99] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 882.
[100] K.A. Mortier, K.E. Maudens, W.E. Lambert, K.M. Clauwaert, J.F. Van Bocxlaer, D.L. Deforce, C.H. Van Peteghem, A.P. De Leenheer, *Journal of Chromatography, B* 779 (2002) 321.
[101] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 3019.
[102] A. Agüera, S. López, A.R. Fernández-Alba, M. Contreras, J. Crespo, L. Piedra, *Journal of Chromatography A* 1045 (2004) 125.
[103] M.R. Moeller, S. Steinmeyer, T. Kraemer, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 713 (1998) 91.
[104] Z. Zhi, W. Cuichen, L. Haipeng, Z. Yuan, Z. Xiaoling, K. Huaizhi, Y. Chaoyong James, T. Weihong, *Angewandte Chemie International Edition* 49 (2010) 1052.
[105] A.-E. Radi, X. Muñoz-Berbel, V. Lates, J.-L. Marty, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 1888.

[106] A.-E. Radi, X. Muñoz-Berbel, M. Cortina-Puig, J.-L. Marty, *Electrochimica Acta* 54 (2009) 2180.
[107] B. Prieto-Simón, M. Campàs, J.-L. Marty, T. Noguer, *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2008) 995.
[108] N. Adányi, I.A. Levkovets, S. Rodriguez-Gil, A. Ronald, M. Váradi, I. Szendro, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 797.
[109] B. Prieto-Simón, T. Noguer, M. Campàs, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007) 689.
[110] B. Liu, Hui, Z. Tsao, Jay, J. Wang, Jhih, F. Yu, Yih, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 7.
[111] J.S. Swensen, Y. Xiao, B.S. Ferguson, A.A. Lubin, R.Y. Lai, A.J. Heeger, K.W. Plaxco, H.T. Soh, *Journal of the American Chemical Society* 131 (2009) 4262.
[112] M.-C. Hennion, V. Pichon, *Journal of Chromatography, A* 1000 (2003) 29.
[113] N. Delaunay-Bertoncini, Thèse intutilée "*Développement d'immunoadsorbants à base d'anticorps monoclonaux pour l'extraction sélective de familles de micropolluants organiques contenus dans des matrices complexes - Comparaison avec des polymères à empreinte moléculaire*", 2001
[114] A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze, *Journal of Chromatography A* 864 (1999) 89.
[115] C. He, Y. Long, J. Pan, K. Li, F. Liu, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70 (2006) 133.
[116] V. Pichon, *Journal of Chromatography, A* 1152 (2007) 41.
[117] K. Haupt, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 376 A.
[118] F. Chapuis, V. Pichon, F. Lanza, B. Sellergren, M.C. Hennion, *Journal of Chromatography B* 804 (2004) 93.
[119] C. Baggiani, G. Giraudi, A. Vanni, *Bioseparation* 10 (2001) 389.
[120] J. Jodlbauer, N.M. Maier, W. Lindner, *Journal of Chromatography A* 945 (2002) 45.
[121] N.M. Maier, G. Buttinger, S. Welhartizki, E. Gavioli, W. Lindner, *Journal of Chromatography B* 804 (2004) 103.
[122] W. Hadj-Ali, D. Derrien, F. Alix, C. Pérollier, O. Lépine, S. Bayoudh, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 6668.
[123] E.V. Piletska, M. Romero-Guerra, A.R. Guerreiro, K. Karim, A.P.F. Turner, S.A. Piletsky, *Analytica Chimica Acta* 542 (2005) 47.
[124] E.V. Piletska, M. Romero-Guerra, I. Chianella, K. Karim, A.P.F. Turner, S.A. Piletsky, *Analytica Chimica Acta* 542 (2005) 111.
[125] E.V. Piletska, A.R. Guerreiro, M. Romero-Guerra, I. Chianella, A.P.F. Turner, S.A. Piletsky, *Analytica Chimica Acta* 607 (2008) 54.
[126] A. Zurutuza, S. Bayoudh, P.A.G. Cormack, L. Dambies, J. Deere, R. Bischoff, D.C. Sherrington, *Analytica Chimica Acta* 542 (2005) 14.
[127] K. Schlosser, S.A. McManus, Y. Li, in S. Klussmann (Editor), The Aptamer Handbook, WILEY-VCH, Weinheim, 2006, p. 228.
[128] www.ktf-split.hr/glossary/image/rna-dna_en.gif, consulté en 2010
[129] http://www.ocf.berkeley.edu/~edy/bases.jpg, consulté en 2010
[130] P. Yakovchuk, E. Protozanova, M.D. Frank-Kamenetskii, *Nucl. Acids Res.* 34 (2006) 564.
[131] F. Chauveau, C. Pestourie, B. Tavitian, *Pathologie Biologie* 54 (2006) 251.

[132] J. Ruta, Thèse intutilée "*Aptamères énantiosélectifs en série ADN et ARN : applications à la séparation chirale en microchromatographie et en électrophorèse capillaire*", 2008
[133] http://schools-wikipedia.org/images/646/64608.png, consulté en 2010
[134] http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3f/Stem-loop.svg, consulté en 2010
[135] http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9f/Pseudoknot.svg, consulté en 2010
[136] http://www-teach.ch.cam.ac.uk/teach/C3/C3%20handout%202005.pdf, consulté en 2010
[137] T. Hermann, D.J. Patel, *Science* 287 (2000) 820.
[138] L. Jiang, A. Majumdar, W. Hu, T.J. Jaishree, W. Xu, D.J. Patel, *Structure* 7 (1999) 817.
[139] G.R. Zimmermann, R.D. Jenison, C.L. Wick, J.-P. Simorre, A. Pardi, *Nat Struct Mol Biol* 4 (1997) 644.
[140] Y. Yang, M. Kochoyan, P. Burgstaller, E. Westhof, M. Famulok, *Science* 272 (1996) 1343.
[141] R.D. Jenison, S.C. Gill, B. Polisky, *Science* 263 (1994) 1425.
[142] P. Burgstaller, M. Famulok, *Angewandte Chemie International Edition in English* 33 (1994) 1084.
[143] M. Sassanfar, J.W. Szostak, *Nature* 364 (1993) 550.
[144] A.D. Ellington, J.W. Szostak, *Nature* 346 (1990) 818.
[145] C. Tuerk, L. Gold, *Science* 249 (1990) 505.
[146] D.L. Robertson, G.F. Joyce, *Nature* 344 (1990) 467.
[147] J.-J. Toulmé, J.-P. Daguer, E. Dausse, in M. Mascini (Editor), Aptamers in Bioanalysis, Wiley, 2009, p. 3.
[148] H.P. Hofmann, S. Limmer, V. Hornung, M. Sprinzl, *RNA* 3 (1997) 1289.
[149] L.C. Bock, L.C. Griffin, J.A. Latham, E.H. Vermaas, J.J. Toole, *Nature* 355 (1992) 564.
[150] L. Cerchia, F. Ducongé, C. Pestourie, J. Boulay, Y. Aissouni, K. Gombert, B. Tavitian, V. de Franciscis, D. Libri, *PLoS Biology* 3 (2005) e123.
[151] J.-J. Toulmé, S. Da Rocha, E. Dausse, L. Azéma, I. Lebars, S. Moreau, *Médecine Nucléaire* 31 (2007) 478.
[152] W. James, in R.A. Meyers (Editor), Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000, p. 4848.
[153] S. Gopinath, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (2007) 171.
[154] B. Strehlitz, R. Stoltenburg, in M. Mascini (Editor), Aptamers in Bioanalysis, Wiley, 2009, p. 31.
[155] M. Berezovski, M. Musheev, A. Drabovich, S.N. Krylov, *Journal of the American Chemical Society* 128 (2006) 1410.
[156] W. Kusser, *Reviews in Molecular Biotechnology* 74 (2000) 27.
[157] S. Klussmann, A. Nolte, R. Bald, V.A. Erdmann, J.P. Furste, *Nat Biotech* 14 (1996) 1112.
[158] J.C. Cox, A.D. Ellington, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9 (2001) 2525.
[159] D. Eulberg, K. Buchner, C. Maasch, S. Klussmann, *Nucl. Acids Res.* 33 (2005) e45.
[160] G. Hybarger, J. Bynum, R. Williams, J. Valdes, J. Chambers, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384 (2006) 191.
[161] C.-J. Huang, H.-I. Lin, S.-C. Shiesh, G.-B. Lee, *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2010) 1761.

[162] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, *Biomolecular Engineering* 24 (2007) 381.
[163] D. Kiga, Y. Futamura, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Nucl. Acids Res.* 26 (1998) 1755.
[164] J.A. Cruz-Aguado, G. Penner, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2008) 10456.
[165] M.N. Stojanovic, P. de Prada, D.W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 4928.
[166] G. Sang Wan, A. Sergey, U. Petri Tapani, V. Daesety, N. Fumiko, K.R.K. Penmetcha, N. Satoshi, *European Journal of Biochemistry* 252 (1998) 553.
[167] M.N. Stojanovic, D.W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 9678.
[168] D.E. Huizenga, J.W. Szostak, *Biochemistry* 34 (1995) 656.
[169] C. Mannironi, A. Di Nardo, P. Fruscoloni, G.P. Tocchini-Valentini, *Biochemistry* 36 (1997) 9726.
[170] J. Ruckman, L.S. Green, J. Beeson, S. Waugh, W.L. Gillette, D.D. Henninger, L. Claesson-Welsh, N. Janjic, *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998) 20556.
[171] N.C. Pagratis, C. Bell, Y.-F. Chang, S. Jennings, T. Fitzwater, D. Jellinek, C. Dang, *Nat Biotech* 15 (1997) 68.
[172] A. Geiger, P. Burgstaller, H. von der Eltz, A. Roeder, M. Famulok, *Nucl. Acids Res.* 24 (1996) 1029.
[173] C. Boiziau, E. Dausse, L. Yurchenko, J.-J. Toulmé, *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999) 12730.
[174] 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.
[175] M. Famulok, *Journal of the American Chemical Society* 116 (1994) 1698.
[176] 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* 103 (2006) 11838.
[177] K.S. Hwang, S.-M. Lee, K. Eom, J.H. Lee, Y.-S. Lee, J.H. Park, D.S. Yoon, T.S. Kim, *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2007) 459.
[178] M.N. Win, J.S. Klein, C.D. Smolke, *Nucleic Acids Research* 34 (2006) 5670.
[179] J.R. Cole, L.W. Dick, E.J. Morgan, L.B. McGown, *Analytical Chemistry* 79 (2006) 273.
[180] D. Mann, C. Reinemann, R. Stoltenburg, B. Strehlitz, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338 (2005) 1928.
[181] M.A. Rehder, L.B. McGown, *Electrophoresis* 22 (2001) 3759.
[182] J. Tang, J. Xie, N. Shao, Y. Yan, *Electrophoresis* 27 (2006) 1303.
[183] Y.S. Kim, C.J. Hyun, I.A. Kim, M.B. Gu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18 (2010) 3467.
[184] B.J. Hicke, S.R. Watson, A. Koenig, C.K. Lynott, R.F. Bargatze, Y.-F. Chang, S. Ringquist, L. Moon-McDermott, S. Jennings, T. Fitzwater, H.-L. Han, N. Varki, I. Albinana, M.C. Willis, A. Varki, D. Parma, *Journal of Clinical Investigation* 98 (1996) 2688.
[185] M.G. Wallis, U. von Ahsen, R. Schroeder, M. Famulok, *Chemistry & Biology* 2 (1995) 543.
[186] J.G. Bruno, J.L. Kiel, *Biosensors and Bioelectronics* 14 (1999) 457.
[187] D.S. Wilson, J.W. Szostak, *Annual Review of Biochemistry* 68 (1999) 611.

[188] E. Ehrentreich-Förster, D. Orgel, A. Krause-Griep, B. Cech, V.A. Erdmann, F. Bier, F.W. Scheller, M. Rimmele, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008) 1793.
[189] Y. Wang, R.R. Rando, *Chemistry & Biology* 2 (1995) 281.
[190] C. Tuerk, S. MacDougal, L. Gold, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (1992) 6988.
[191] M.N. Stojanovic, P. de Prada, D.W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 11547.
[192] D.H. Burke, D.C. Hoffman, *Biochemistry* 37 (1998) 4653.
[193] J. Floege, T. Ostendorf, U. Janssen, M. Burg, H.H. Radeke, C. Vargeese, S.C. Gill, L.S. Green, N. Janjic, *Am J Pathol* 154 (1999) 169.
[194] K. Srinivasan, P. Wang, A.T. Eley, C.A. White, M.G. Bartlett, *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 745 (2000) 287.
[195] S.D. Jayasena, *Clin Chem* 45 (1999) 1628.
[196] M. Famulok, G. Mayer, in S. Klussmann (Editor), The aptamer Handbook, WILEY-VCH, Weinheim, 2006, p. 280.
[197] T.L. Symensma, L. Giver, M. Zapp, G.B. Takle, A.D. Ellington, *J. Virol.* 70 (1996) 179.
[198] L.C. Griffin, G.F. Tidmarsh, L.C. Bock, J.J. Toole, L.L. Leung, *Blood* 81 (1993) 3271.
[199] 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, *Nat Biotech* 22 (2004) 1423.
[200] L.I.N. Yun, P. Abeysinghe, Morden, M. K, Jayasena, D. S, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (1995) 5.
[201] C. Pestourie, B. Tavitian, F. Duconge, *Biochimie* 87 (2005) 921.
[202] B. Strehlitz, N. Nikolaus, R. Stoltenburg, *Sensors* 8 (2008) 4296.
[203] Y. Xiao, A.A. Lubin, A.J. Heeger, K.W. Plaxco, *Angewandte Chemie International Edition* 44 (2005) 5456.
[204] B.R. Baker, R.Y. Lai, M.S. Wood, E.H. Doctor, A.J. Heeger, K.W. Plaxco, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 3138.
[205] Y. Li, H. Qi, Y. Peng, J. Yang, C. Zhang, *Electrochemistry Communications* 9 (2007) 2571.
[206] E. Golub, G. Pelossof, R. Freeman, H. Zhang, I. Willner, *Analytical Chemistry* 81 (2009) 9291.
[207] R.A. Potyrailo, R.C. Conrad, A.D. Ellington, G.M. Hieftje, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 3419.
[208] J.A. Cruz-Aguado, G. Penner, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 8853.
[209] C.-y. Zhang, L.W. Johnson, *Analytical Chemistry* 81 (2009) 3051.
[210] F. Li, J. Zhang, X. Cao, L. Wang, D. Li, S. Song, B. Ye, C. Fan, *Analyst* 134 (2009) 1355.
[211] J. Liu, Y. Lu, *Angewandte Chemie, International Edition* 45 (2006) 90.
[212] T. Hianik, V. Ostatná, Z. Zajacová, E. Stoikova, G. Evtugyn, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15 (2005) 291.
[213] C.A. Savran, S.M. Knudsen, A.D. Ellington, S.R. Manalis, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 3194.
[214] B. Prieto-Simón, M. Campàs, J.-L. Marty, *Bioanalytical reviews* (2010).
[215] M. Levy, S.F. Cater, A.D. Ellington, *ChemBioChem* 6 (2005) 2163.

[216] J. Zhang, L. Wang, D. Pan, S. Song, F.Y.C. Boey, H. Zhang, C. Fan, *Small* 4 (2008) 1196.
[217] S. Tombelli, M. Minunni, E. Luzi, M. Mascini, *Bioelectrochemistry* 67 (2005) 135.
[218] M.D. Schlensog, T.M.A. Gronewold, M. Tewes, M. Famulok, E. Quandt, *Sensors and Actuators B: Chemical* 101 (2004) 308.
[219] J. Vivekananda, J.L. Kiel, *Lab Invest* 86 (2006) 610.
[220] J. Liu, D. Mazumdar, Y. Lu, *Angewandte Chemie, International Edition* 45 (2006) 7955.
[221] I. German, D.D. Buchanan, R.T. Kennedy, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 4540.
[222] E. Baldrich, J.L. Acero, G. Reekmans, W. Laureyn, C.K. O'Sullivan, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 4774.
[223] M. Mir, M. Vreeke, I. Katakis, *Electrochemistry Communications* 8 (2006) 505.
[224] R. Polsky, R. Gill, L. Kaganovsky, I. Willner, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 2268.
[225] Y. Li, H.J. Lee, R.M. Corn, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 1082.
[226] Y. Ito, S. Fujita, N. Kawazoe, Y. Imanishi, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 3510.
[227] D.W. Drolet, L. Moon-McDermott, T.S. Romig, *Nature Biotechnology* 14 (1996) 1021.
[228] C. O'Sullivan, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 372 (2002) 44.
[229] T. Mairal, V.C. Özalp, P.L. Sanchez, M. Mir, I. Katakis, C.K. O'Sullivan, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390 (2008) 989.
[230] C. Giovannoli, C. Baggiani, L. Anfossi, G. Giraudi, *Electrophoresis* 29 (2008) 3349.
[231] C. Ravelet, C. Grosset, E. Peyrin, *Journal of Chromatography, A* 1117 (2006) 1.
[232] S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini, *Biosensors & Bioelectronics* 20 (2005) 2424.
[233] S.L. Clark, V.T. Remcho, *Electrophoresis* 23 (2002) 1335.
[234] S. Ringquist, D. Parma, *Cytometry Part A* 33 (1998) 394.
[235] K. Davis, Y. Lin, B. Abrams, S. Jayasena, *Nucleic Acids Research* 26 (1998) 3915.
[236] Z. Tang, D. Shangguan, K. Wang, H. Shi, K. Sefah, P. Mallikratchy, H.W. Chen, Y. Li, W. Tan, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 4900.
[237] J.A. Phillips, Y. XU, Z. Xia, Z.H. Fan, W. Tan, *Analytical Chemistry* 81 (2009) 1033.
[238] Q. Deng, I. German, D. Buchanan, R.T. Kennedy, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 5415.
[239] Q. Zhao, X.-F. Li, X.C. Le, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 3915.
[240] M. Michaud, E. Jourdan, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, E. Peyrin, *Journal of the American Chemical Society* 125 (2003) 8672.
[241] A. Brumbt, C. Ravelet, C. Grosset, A. Ravel, A. Villet, E. Peyrin, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 1993.
[242] C. Ravelet, R. Boulkedid, A. Ravel, C. Grosset, A. Villet, J. Fize, E. Peyrin, *Journal of Chromatography, A* 1076 (2005) 62.
[243] J. Ruta, C. Grosset, C. Ravelet, J. Fize, A. Villet, A. Ravel, E. Peyrin, *Journal of Chromatography B* 845 (2007) 186.

[244] J. Ruta, C. Ravelet, J. Désiré, J.-L. Décout, E. Peyrin, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390 (2008) 1051.
[245] S. Cho, S.-H. Lee, W.-J. Chung, Y.-K. Kim, Y.-S. Lee, B.-G. Kim, *Electrophoresis* 25 (2004) 3730.
[246] W.-J. Chung, M.-S. Kim, S. Cho, S.-S. Park, J.-H. Kim, Y.-K. Kim, B.-G. Kim, Y.-S. Lee, *Electrophoresis* 26 (2005) 694.
[247] S.L. Clark, V.T. Remcho, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 5692.
[248] M.A. Rehder-Silinski, L.B. McGown, *Journal of Chromatography A* 1008 (2003) 233.
[249] J.D. Burdick, R.L. Boni, F.W. Fochtman, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15 (1997) 1167.
[250] T.S. Romig, C. Bell, D.W. Drolet, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 731 (1999) 275.
[251] Q. Zhao, X.-F. Li, Y. Shao, X.C. Le, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 7586.
[252] Y.-F. Huang, H.-T. Chang, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 4852.
[253] A.C. Connor, L.B. McGown, *Journal of Chromatography A* 1111 (2006) 115.
[254] T. Nguyen, R. Pei, M. Stojanovic, Q. Lin, *Proceedings of the 2nd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems* (2007) 997.
[255] T. Nguyen, R. Pei, M. Stojanovic, Q. Lin, *Microfluidics and Nanofluidics* 6 (2009) 479.
[256] T.H. Nguyen, R. Pei, M. Stojanovic, Q. Lin, *Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference, 2007. TRANSDUCERS 2007. International* (2007) 1857
[257] T. Nguyen, R. Pei, M. Stojanovic, Q. Lin, *IEEE Int. Conf. Micro Electro Mechanical Systems (MEMS '08)* (2008) 196.
[258] T. Nguyen, R. Pei, D.W. Landry, M.N. Stojanovic, Q. Lin, *Sensors and Actuators B: Chemical* Article in Press, Corrected Proof (2009).
[259] T.H. Nguyen, R. Pei, M. Stojanovic, D. Landry, Q. Lin, in Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference, 2009. TRANSDUCERS 2009., Denver, 2009.
[260] A. Holmberg, A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundeberg, M. Uhlén, *Electrophoresis* 26 (2005) 501.
[261] E. Peyrin, *Journal of Separation Science* 32 (2009) 1531.
[262] C.R. Allerson, A. Martinez, E. Yikilmaz, T.A. Rouault, *RNA* 9 (2003) 364.
[263] L.A. Chrisey, G.U. Lee, C.E. O'Ferrall, *Nucl. Acids Res.* 24 (1996) 3031.
[264] R.B. Kotia, L. Li, L.B. McGown, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 827.
[265] M.J. O'Donnell, K. Tang, H. Köster, C.L. Smith, C.R. Cantor, *Analytical Chemistry* 69 (1997) 2438.
[266] A. Cingöz, F. Hugon-Chapuis, V. Pichon, *Journal of Chromatography B* 878 (2010) 213.
[267] C. Maisonnette, P. Simon, M.-C. Hennion, V. Pichon, *Journal of Chromatography, A* 1120 (2006) 185.
[268] A. Cingöz, F. Hugon-Chapuis, V. Pichon, *Journal of Chromatography, A* 1209 (2008) 95.
[269] V. Pichon, L. Chen, M.C. Hennion, R. Daniel, A. Martel, F.L. Goffic, J. Ablan, D. Barcelo, *Analytical Chemistry* 67 (1995) 2451.
[270] E. Grushka, Bonded stationary phases in chromatography, Ann Arbor Science Publishers, 1974.

[271] B. Kaboord, R. Liermann, *Pierce application notes* AN0014.0 (2006).
[272] Q. Deng, C.J. Watson, R.T. Kennedy, *Journal of Chromatography A* 1005 (2003) 123.
[273] M. Michaud, E. Jourdan, C. Ravelet, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, E. Peyrin, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 1015.
[274] V. Pichon, M. Bouzige, C. Miège, M.-C. Hennion, *Trends in Analytical Chemistry* 18 (1999) 219.
[275] M. Gilar, K.J. Fountain, Y. Budman, U.D. Neue, K.R. Yardley, P.D. Rainville, R.J. Russell Ii, J.C. Gebler, *Journal of Chromatography A* 958 (2002) 167.
[276] K. Gebhardt, A. Shokraei, E. Babaie, B.H. Lindqvist, *Biochemistry* 39 (2000) 7255.
[277] P.L. Sazani, R. Larralde, J.W. Szostak, *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004) 8370.
[278] T. Kato, K. Yano, K. Ikebukuro, I. Karube, *Nucleic Acids Research* 28 (2000) 1963.
[279] M.N. Stojanovic, T.S. Worgall, *Current Opinion in Chemical Biology* In Press, Corrected Proof (2010).
[280] B.M. Magnusson, S.E. Cross, G. Winckle, M.S. Roberts, *Skin Pharmacology and Physiology* 19 (2006) 336.
[281] J.M. Hebden, C.G. Wilson, R.C. Spiller, P.J. Gilchrist, E. Blackshaw, M.E. Frier, A.C. Perkins, *Pharmaceutical Research* 16 (1999) 1087.
[282] A. Roda, A. Minutello, M.A. Angellotti, A. Fini, *Journal of Lipid Research* 31 (1990) 1433.
[283] Z. Zhu, C. Wu, H. Liu, Y. Zou, X. Zhang, H. Kang, C. Yang, W. Tan, *Angewandte Chemie International Edition* 49 (2010) 1052.
[284] A.J. Jenkins, J.M. Oyler, E.J. Cone, *Journal of Analytical Toxicology* 19 (1995) 359.
[285] http://musibiol.net/biologie/cours/sang/textes/plas_com.htm, in, 2010.
[286] D.J. Edwards, S.K. Bowles, *Pharmaceutical Research* 5 (1988) 440.
[287] R.B. Parker, C.L. Williams, S.C. Laizure, J.J. Lima, *J Pharmacol Exp Ther* 275 (1995) 605.
[288] J. Sukbuntherng, D.K. Martin, Y. Pak, M. Mayersohn, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85 (1996) 567.
[289] J. Chamberlain, in C. Press (Editor), The analysis of drugs in biological fluids, 1995, p. 39.
[290] A. Ghasemi, M. Hedayati, H. Biabani, *Journal of medical Sciences Research* 2 (2007) 29.
[291] L. Jiang, L. He, M. Fountoulakis, *Journal of Chromatography A* 1023 (2004) 317.
[292] C. Polson, P. Sarkar, B. Incledon, V. Raguvaran, R. Grant, *Journal of Chromatography B* 785 (2003) 263.
[293] F. Romitelli, S.A. Santini, E. Chierici, D. Pitocco, B. Tavazzi, A.M. Amorini, G. Lazzarino, E. Di Stasio, *Journal of Chromatography B* 851 (2007) 257.
[294] R. Sakuma, T. Nishina, M. Kitamura, *Clin Chem* 33 (1987) 1427.
[295] S. Souverain, S. Rudaz, J.L. Veuthey, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35 (2004) 913.

Annexes

Annexe 1 : Procédures d'immobilisation

I. Immobilisation sur de la sépharose activée thiol

24 nmoles d'aptamères anti-cocaïne, amino-modifiés en leur extrémité 5' avec un bras espaceur C6, ont été ajoutés à 0,65 mg de sulfo-SIAB dans 288,3 µL de phosphate de sodium (200 mM, pH=8) pour 6h à température ambiante et dans le noir. Les aptamères sont ensuite précipités dans l'éthanol, séchés, et resolubilisés dans une solution de phosphate de sodium (132 µL, 180 mM, pH=8, [NaCl]=5 mM). Les aptamères sont renaturés par chauffage à 85°C pendant 3 min, suivi d'un refroidissement rapide par de la glace. 35 mg de sepharose activée thiol (*activated thiol-sepharose (4B)*, Sigma-Aldrich) sont ensuite lavés par 6 mL d'eau ultrapure et 6 mL d'un tampon Tris/HCl (200 mM, pH=7,5, [NaCl]=20mM). 3 mL d'une solution préalablement désoxygénée contenant 20 mM de Dithiothréitol, 200 mM de tampon Tris/HCl (200 mM, pH=7,5) et 20mM de NaCl sont ensuite ajoutés, suivis par un lavage par 4,5 mL d'une solution également désoxygénée contenant 200 mM de Tris/HCl (pH=7,5) et 20 mM de NaCl. La solution contenant les aptamères est ensuite incubée avec le support activé pendant 12 à 16h dans le noir à température ambiante. L'oligoadsorbant obtenu est ensuite lavé et placé entre deux frittés dans une cartouche SPE de 1 mL avec au moins 4 mL de Tris/HCl (200 mM, pH=7,5). Les groupements thiols n'ayant pas réagit sont bloqués par un traitement par une solution constituée de Tris/HCl (200 mM, pH=7,5) et de iodoacétamide (10 mM). Un support de contrôle a été synthétisé en suivant la même procédure mais sans aptamères.

II. Immobilisation sur la silice activée glutaraldehyde

30 mg de silice activée sont successivement lavés par 2 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH=6) et NaCl (1M), puis par 2 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH=6) et $MgCl_2$ (1mM). 100 µg d'aptamères amino-modifiés en 5' avec un espaceur

C12 sont solubilisés dans 100 µL de tampon phosphate (0,1 M, pH=6) et $MgCl_2$ (1mM) et renaturés en chauffant cette solution à 90°C pendant 10 min et en la laissant refroidir à température ambiante pendant 30 min. Cette solution est ensuite incubée une nuit avec le support de silice (35 mg, glutaraldehyde-activated silica (40 µm), Mallinckrodt Baker) à température ambiante. Le surnageant est ensuite éliminé et le support est lavé par 1 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH=6) et $MgCl_2$ (1mM), et quelques milligrammes de $NaBH_3CN$ sont ajoutés. Après une nuit à 4°C, l'oligoadsorbant obtenu et placé entre deux frittés dans une cartouche SPE de 1 mL, puis le support est lavé par 5 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH=6), 5mL de tampon phosphate (0,1 M, pH=6) et NaCl (1M), 5 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH=6)/éthylène glycol (90/10, V/V), puis par 5 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH=6). Les sites actifs n'ayant pas réagit sont ensuite bloqués par une solution d'éthanolamine (0,2M) mise en contact pendant 2h. L'oligoadsorbant est ensuite rincé par 5 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH=6) et 5mL de tampon phosphate (0,1 M, pH=6) et NaCl (1M). Une autre synthèse a été effectuée en présence de 50 µL de cocaïne à 89 ppm ajoutés à la solution d'immobilisation. Un support de contrôle a été synthétisé en suivant la même procédure mais sans aptamères.

III. Immobilisation sur l'agarose activée streptavidine

9 nmoles d'aptamères biotinylés en leur extrémité 5' sont solubilisées dans 3 mL d'un tampon composé de Na_2HPO_4 (10 mM), KH_2PO_4 (1.8 M), NaCl (0.17 M), KCl (3.3 mM) et EDTA (1mM) ajusté à pH=7.4. Les aptamères sont ensuite renaturés par chauffage à 75°C pendant 5 min, et la solution est laissé à température ambiante pour 30 min. 300 µL de la solution de billes d'agarose activée en suspension (streptavidin activated agarose (CL-4B), Sigma-Aldrich) sont ajoutés à la solution d'aptamères et laissés incubés une nuit à température ambiante. L'adsorbant est ensuite placé entre deux frittés dans une cartouche SPE d'un millilitre puis lavé par 10 mL du tampon Na_2HPO_4 (10 mM), KH_2PO_4 (1.8 M), NaCl (0.17 M), KCl (3.3 mM) et EDTA (1mM) ajusté à pH=7.4. Un support de contrôle est synthétisé en parallèle en suivant la même procédure d'immobilisation mais en remplaçant les aptamères par 9 nmoles de biotine.

IV. Immobilisation sur la sepharose activée CNBr

Les aptamères sont solubilisés à 1 g/L dans une solution composée de Na_2HPO_4 (200 mM) et $MgCl_2$ (5 mM) ajustée à pH=8. Avant immobilisation, les aptamères sont renaturés par chauffage de la solution à 75 °C pour 5 min est refroidissement progressif pendant 30 min à température ambiante. 35 mg de sepharose activée CNBr (CNBr-activated Sepharose (4B, 90 µm), Sigma-Aldrich) sont rincés 6 fois par 1 mL de HCl (pH=3), puis par 1 mL d'eau ultrapure, et enfin par 175 µL de tampon Na_2HPO_4 (200 mM), et $MgCl_2$ (5 mM) pH=8. 150 µL de la solution d'aptamères sont incubés avec le support une nuit à température ambiante. L'adsorbant est ensuite placé entre deux frittés dans une cartouche SPE de 1 mL et lavé par 3 mL de Na_2HPO_4 (200 mM, pH 8). Les sites actifs du support n'ayant pas réagis sont neutralisés par une solution de Tris (0,1 M, pH=8) mise en contact pendant 2 heures. Le gel est ensuite lavé trois fois par alternativement 2 mL de tampon acétate (0,1 M) et NaCl (0,5M) ajusté à pH=4 et 2 mL de tampon Tris (0,1M) et NaCl (0,5 M) ajustée à pH=8. Un support de contrôle a été synthétisé en suivant la même procédure mais sans aptamères.

Annexe 2 : Méthodes d'analyse chromatographique de la cocaïne

I. Analyse par chromatographie liquide couplée à la détection par absorbance UV

1. Système utilisé

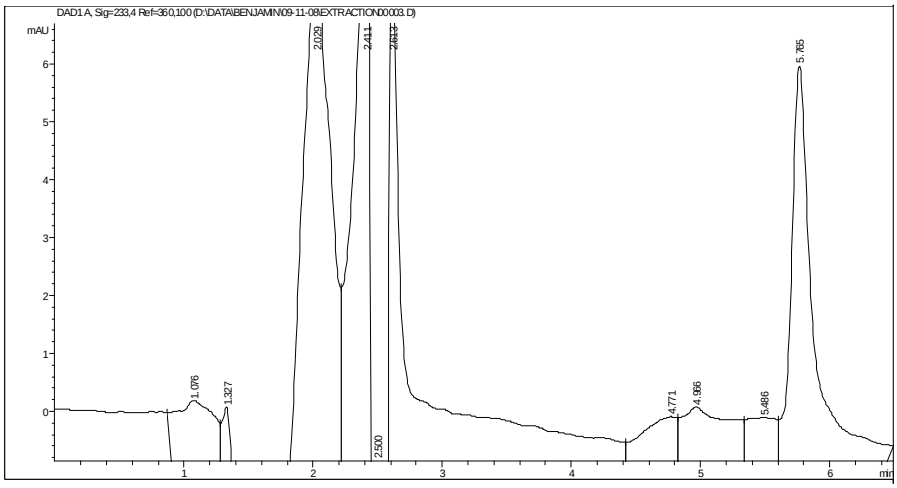
Chaîne de chromatographie liquide Agilent 1200 series équipée d'une pompe analytique binaire, d'un passeur d'échantillon, et d'un détecteur d'absorbance UV à barrettes de diodes contrôlés par le logiciel Chemstation.

La séparation de la cocaïne et de la benzoylecgonine est effectuée avec une colonne SymmetryShield RP18 (150 x 2.1 mm, 3.5 µm, Waters) placée dans un four à colonne maintenu à 35°C

2. Conditions analytiques

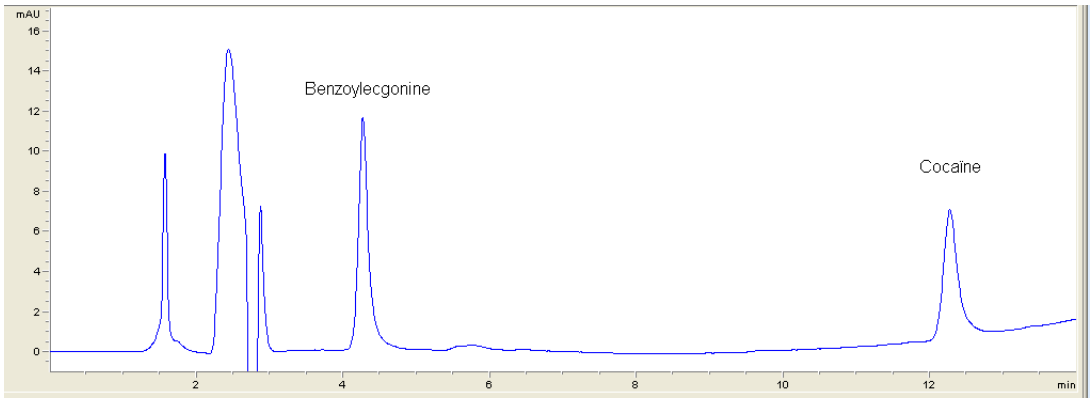
a. Quantification de la cocaïne seule

La séparation est réalisée en mode isocratique à un débit de 0,2 mL/min avec une phase mobile constituée de 62 % de tampon phosphate (5 mM, pH=6), et 38% d'acétonitrile à un débit de 0,2 mL/min. La longueur d'onde de détection est 233 nm. Le volume injecté est de 20 µL. La figure suivante présente un chromatogramme correspondant à l'analyse d'une solution de cocaïne à 0,3 ppm. Les limites de détection atteintes



b. Séparation et quantification d'un mélange de cocaïne et de benzoylecgonine

La séparation est réalisée en mode gradient en utilisant les mêmes phases mobiles que pour la quantification de la cocaïne seule. Le pourcentage d'acétonitrile est augmenté de 19 à 40 % en 10 minutes. Le débit est de 0,2 mL/min, la longueur d'onde de détection de 233 nm et le volume injecté est de 20 µL. La figure suivante présente un chromatogramme correspondant à l'analyse d'un mélange de cocaïne et de benzoylecgonine à 0,1 ppm.



Les limites de détection sont de 1,6 ppb pour la benzoylecgonine et 3,8 ppb pour la cocaïne.

II. Analyse par chromatographie liquide couplée à la détection par spectrométrie de masse

1. Système utilisé

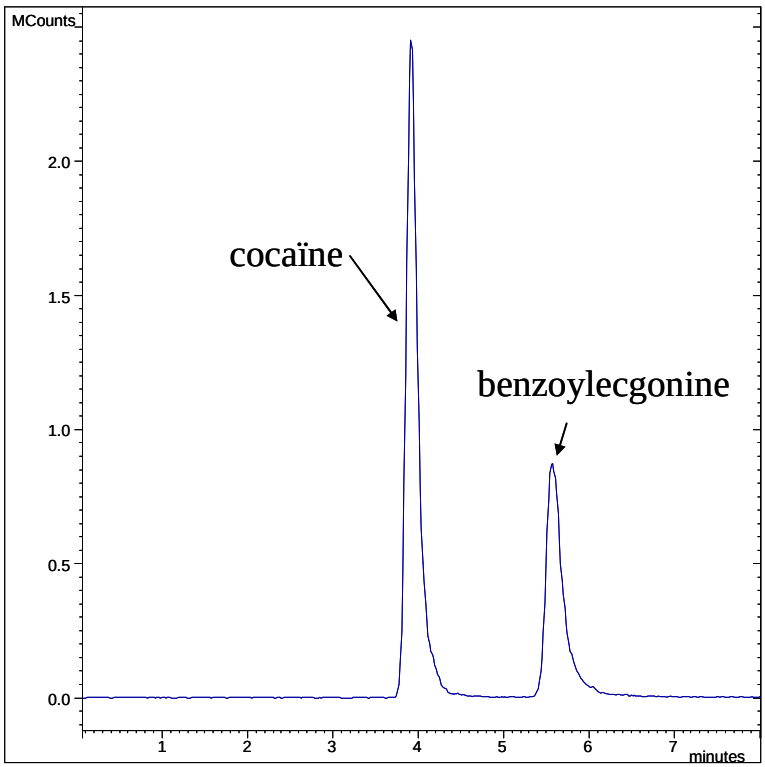
Un spectromètre de masse triple quadripôle Varian 320 a été couplé, via une source d'ionisation par electrospray, à un système de chromatographie liquide constitué d'une pompe analytique Varian 212 LC et d'un passeur d'échantillons ProStar 410.

La séparation de la cocaïne et de la benzoylecgonine est effectuée avec une colonne SymmetryShield RP18 (150 x 2.1 mm, 3.5 µm, Waters) dont la température est maintenue à 20°C.

2. Conditions analytiques

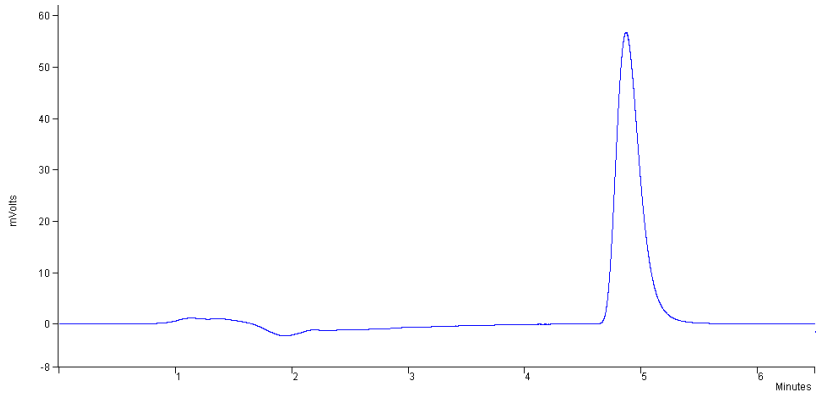
La cocaïne (m/z=304,1) est détectée en mode SIM avec un potentiel de capillaire (cône) de 80 V.

La séparation est réalisée en mode isocratique à un débit de 0,2 mL/min par un mélange de 82 % d'eau et de 18 % d'acétonitrile, tous deux acidifiés par de l'acide formique à 0,2 % (V/V). Le volume injecté est de 20 µL. La figure suivante présente un chromatogramme correspondant à l'analyse d'une solution dopée par de la cocaïne et de la benzoylecgonine.


MCounts
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
cocaïne
benzoylecgonine
1
2
3
4
5
6
7
minutes

Annexe 3 : Analyse chromatographique de l'OTA

Le système HPLC est constitué d'un passeur d'échantillons (Water 717, Saint Quentin en Yvelines, France) et un système Varian Prostar comportant une pompe (Prostar 230) et un détecteur fluorescent (Prostar 330). L'OTA est séparée sur colonne en phase inverse de type Waters SunFireTM C18 (5 µm 150 x 2,1 mm di). La phase mobile est constituée d'acétonitrile-eau-acide acétique (59,5 :39,5 :1) avec un débit de 0,2 ml/min. L'ochratoxine A est détectée par fluorescence (λ_{ex}= 333 nm ; λ_{em}=460 nm). Les volumes d'échantillons injectés sont de 20 µl. La figure suivante présente un chromatogramme correspondant à l'injection de 0.25 ng d'Ochratoxine A.



La limite de quantification a été estimée à 60 ng/L.

Annexe 4 : Méthode d'analyse chromatographique des aptamères

1. Système utilisé

Le système est identique à celui décrit dans l'annexe 2. La colonne est placée ici à 50 °C ;

2. Conditions analytiques

Une chromatographie de paire d'ions a été utilisée avec un tampon acétate de triéthylammonium (0,1 M, pH=7) comme solvant A et l'acétonitrile comme solvant B. Un mode gradient a été utilisé à un débit de 0,2 mL/min, allant de 7 % jusqu'à 14,5 % de B en 30 min. La détection est réalisée à 260 nm. Le volume d'injection est de 25 µL

Annexe 5 : Détermination de la composition de la solution de neutralisation après précipitation des protéines par le TCA

150 µL de surnageant, issus de l'étape de précipitation des protéines, et contenant 30,5 µmoles de TCA doivent être neutralisés par 50 µL d'une solution de neutralisation. Le pH final doit être de 7,4 et les concentrations des ions très proches de celles du tampon de sélection. La base utilisée pour la neutralisation est le Tris. Deux contraintes se présentent, le pH final nous impose que le rapport des concentrations de la forme basique sur la forme acide doit être égal à 0,13 (valeur déduite du pH final et du pKa du couple), et la forme acide doit représenter 30,5 µmoles (issues de la réaction du TCA sur la forme basique du Tris). Il faut donc que la concentration initiale en Tris dans ce tampon de neutralisation soit égale à 0,69 M.

Concernant les concentrations des ions, les quantités apportées par l'échantillon de sang ont été prises en compte. Voici les quantités apportées par le sang pour chaque ion : Na^+=14 µmoles, K^+=0,48 µmoles, Mg^{2+}=0,08 µmoles. Afin que les concentrations après neutralisation soient égales à celles du tampon de sélection, le tampon de neutralisation devra avoir comme composition : [KCl]=10,4 mM, [$MgCl_2$]=2,4 mM et [NaCl]=0,28 M.

Annexe 6 : Précipitation des protéines

I. Précipitation par l'acide trichloracétique (TCA)

475 µL d'une solution de TCA à 10 % (m/V) sont ajoutés à 950 µL de plasma. Le mélange est passé au vortex pendant 20 secondes, puis laissé 20 min à 4°C et enfin centrifugé à 3000 rpm avec r=12 cm (ce qui correspond 1210 g). 150 µL du surnageant sont ensuite ajoutés à 50 µL du tampon de neutralisation décrit en annexe 4.

II. Précipitation par l'acétonitrile

400 µL d'acétonitrile sont ajoutés à 200 µL de plasma. Le mélange est passé au vortex pendant 20 secondes, puis centrifugé à 6000 g pendant 5 min. 75 µL du surnageant sont évaporés à sec sous flux d'azote et repris dans 100 µL de tampon de sélection pour une oligoextraction, ou dans 200 µL d'eau pH=4 pour une injection directe.

Annexe 7 : Procédures d'extraction sur phase solide conventionnelle et d'immunoextraction de l'OTA

1. Procédure d'immunoextraction (protocole OENO 16/2001)

La cartouche utilisée pour l'immunoextraction de l'OTA est la Puri-Fast OTA IAC, 500 mg de LIBIOS (Bully France). Le protocole d'extraction appliqué est le suivant :

- Percolation : 10mL du mélange vin dopé à 2µg/L/solution de dilution (50:50)
- Lavage : 5mL de solution de lavage puis 5mL d'eau-
- Élution : 2mL de méthanol
- Évaporation de la fraction d'élution sous N_2 puis redissolution dans 2.5ml eau/acn (60:40)

La solution de dilution est constituée de polyethylèmeglycol (1%) et de $NaHCO_3$ (5%) dans l'eau. La solution de lavage est quand à elle constituée de NaCl (2,5 %) et de $NaHCO_3$ (0,5 %).

2. Procédure d'extraction sur C18

La cartouche utilisée est la Discovery DSC-18, 100 mg (Supelco, Sigma-Aldrich). Le protocole d'extraction appliqué est le suivant :

- Percolation : 2 mL du mélange vin dopé à 2µg/L/eau (50:50)
- Lavage : 400 µL d'eau puis 400 µL d'un mélange eau/méthanol (40/60)
- Élution : 400 µL méthanol
- Évaporation de la fraction d'élution sous N_2 puis redissolution dans 500 µL eau/acn (60:40)

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

Figure 1 : (A) : Structure de la cocaïne ; (B) : Chlorhydrate de cocaïne ; (C) : « Crack » *26*
Figure 2 : Transmission de l'influx nerveux en absence et en présence de cocaïne [3] *27*
Figure 3 : Schéma du métabolisme de la cocaïne. Adapté de [5] *28*
Figure 4 : Structure de l'ochratoxine A *32*
Figure 5 : Protocole d'extraction sur phase solide. [81] *35*
Figure 6 : Cartouches pour l'extraction sur phase solide. Adapté de [85,86] *39*
Figure 7 : Disque pour l'extraction sur phase solide et son dispositif [88] *39*
Figure 8 : Plaque SPE de 96 cartouches [89] *40*
Figure 9 : Couplage en ligne de l'extraction sur phase solide avec la chromatographie en phase liquide [82]. *41*
Figure 10 : Exemple d'effet de matrice en LC-MS². Analyse du triflumizol dans différents légumes dopés à la même quantité. Adapté de [102] *46*
Figure 11 : Principe de la synthèse de polymères à empreintes moléculaires. Adapté de [117] *50*
Figure 12 : Chromatogrammes obtenus après l'injection d'un extrait de sol dopé par des pesticides sans traitement (A) et avec traitement par un polymère à empreintes moléculaires (B) et un immunoadsorbant (C). (1) atrazine; (2) simazine; (3) terbutylazine. Adapté de [118] *53*
Figure 13 : Structure des acides nucléiques et de leurs bases. Adapté de [128] *58*
Figure 14 : Les paires de bases canoniques et leur appariement par liaisons hydrogène. Adapté de [129] *59*
Figure 15 : Représentation schématique des principaux motifs structuraux. (A) : la double hélice [133] ; (B) : la tige boucle [134] ; (C) : le pseudo-nœud [135] ; (D) : Structure (gauche) et empilement (droite) des tétrades de G [136] *60*
Figure 16 : Représentation de la structure tertiaire des complexes (a) aptamère-néomycine B (b) aptamère-tobramycine. La structure de l'aptamère est représentée en rubans et bâtons et les molécules sont représentées en boules pleines [138] *62*
Figure 17 : Principe général de l'identification d'aptamères par le procédé SELEX [131] *64*
Figure 18 : Représentation schématique du fonctionnement d'un capteur électrochimique à thrombine (A) [203], et de deux capteurs à cocaïne (B) [204] et (C) [206] *77*
Figure 19 : Capteur de cocaïne par inhibition de fluorescence [165]. (F : fluorescéine, D : inhibiteur de fluorescence) *80*
Figure 20 : Capteur colorimétrique de cocaïne basé sur l'agrégation de nanoparticules d'or en présence de cocaïne. Adapté de [210] *81*
Figure 21 : Représentation schématique de la détection colorimétrique de la cocaïne basée sur la dispersion de nanoparticules liées par l'aptamère anti-cocaïne [211] *81*
Figure 22 : Principe du capteur colorimétrique à cocaïne basé sur le déplacement d'un chromophore [167] *82*
Figure 23 : Formats utilisés par les bioessais utilisant des aptamères. (A) : Format à un seul site pour la détection d'une petite molécule ; (B) : Format à un seul site pour la détection d'une macromolécule ; Format à deux site (type « sandwich ») pour la détection d'une macromolécule. Adapté de [216] *84*
Figure 24 : Représentation schématique des méthodes d'analyse en format non compétitif et compétitif en électrophorèse capillaire. Adapté de [230] *88*
Figure 25 : Capteur de cocaïne en format « bandelette ». A) : Représentation schématique de la bandelette avant utilisation (1), après un test négatif (2) et après un test positif (3) (les agrégats de nanoparticules sont représentés en bleu et la ligne de streptavidine immobilisée en cyan). B) Détection de différente concentrations de cocaïne (mM) dans du sérum humain. Adapté de [220] .. *89*

Figure 26 : Chromatogrammes résultants de séparations effectuées sur des phases stationnaires à base d'aptamères. (A) Séparation de l'adénosine et des analogues structuraux (AA : acide ascorbique) [238]. (B) Analyse d'un sérum humain dopé par le cytochrome C [239]..... 91
Figure 27 : (A) : Elution de la sélectine par un gradient d'EDTA après lavage par un tampon [250]. (B) : (a) Elution de thrombine par une solution de $NaClO_4$ après lavage par un tampon. (b-d) Injection de différentes protéines pour l'étude de la sélectivité. (e) Injection de la thrombine sur un support de contrôle sans aptamères pour évaluer les interactions non spécifiques [251] 94
Figure 28 : Représentation schématique (a) et photographie (b) du microsystème. p1 et p2 représentent les réservoirs d'entrée et de sortie. p3 représente l'entrée pour la mise en place des billes dans la chambre. Adapté de [255]..... 95
Figure 29 : Représentation schématique (a) et photographie (b) du microsystème. Adapté de [258] 96
Figure 30 : Structure secondaire de l'aptamère anti-cocaïne lié à sa cible (ellipse noire). Adapté de [165] 102
Figure 31 : Séquence de l'aptamère anti-ochratoxine A. 102
Figure 32 : Réactions de greffage des aptamères sur les supports étudiés. (A) : Immobilisation d'aptamères amino-modifiés sur un support de sepharose activée thiol via un crosslinker. (B) : Immobilisation d'aptamères amino-modifiés sur de la silice activée glutaraldehyde. (C) : Immobilisation d'aptamères biotinylés sur de l'agarose activée streptavidine. (D) : Immobilisation d'aptamères amino-modifiés sur de la sepharose CNBr. 105
Figure 33 : Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant synthétisé avec la sépharose activée thiol. Percolation : 500 µL tampon de sélection dopé par de la cocaïne (T=4°C). Lavage : 500 µL de tampon de sélection (T=4°C). Elution : 500 µL d'un mélange eau/acétonitrile 60/40 (V/V) (T=25°C). 107
Figure 34 : Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant synthétisé avec la silice activée glutaraldehyde. Percolation : 100 µL tampon de sélection dopé par de la cocaïne (T=4°C). Lavage : 100 µL de tampon de sélection (T=4°C). Elution : 100 µL d'un mélange eau/acétonitrile 60/40 (V/V). (T=25°C). 108
Figure 35 : Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant $COC_{Strepta}$ n°1 synthétisé à partir d'agarose activée streptavidine. P (Percolation) : 500 µL tampon de sélection dopé par de la cocaïne (T=4°C). L (Lavage) : 500 µL de tampon de sélection (T=4°C). E (Elution) : 500 µL d'eau pure à 60°C 110
Figure 36 : Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant $COC_{Strepta}$ n°1 synthétisé à partir d'agarose activée streptavidine. Percolation : 500 µL tampon de sélection dopé par de la cocaïne (T=4°C). Lavage : 500 µL de tampon de sélection (T=4°C). Elution : 1000 µL d'un mélange eau/acétonitrile 90/10 (V/V) à 60°C. Moyennes et écarts types sur 3 répétitions. 111
Figure 37 : Profil d'extraction obtenu neuf mois après la synthèse. Procédure identique à celle de la figure 36. 112
Figure 38 : Courbes de capacité de l'oligoadsorbant $COC_{Strepta}$ n°1 et de son support de contrôle synthétisés à partir d'agarose activée streptavidine. Procédure identique à celle de la figure 36.... 113
Figure 39 : Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant $COC_{Strepta}$ n°2 synthétisé à partir d'agarose activée streptavidine. Procédure identique à celle de la figure 36 114
Figure 40 : Profil d'extraction obtenu sur le support synthétisé avec la sépharose activée CNBr. Percolation : tampon de sélection dopé par de la cocaïne (T=4°C). Lavage : tampon de sélection (T=4°C). Elution : mélange eau/acétonitrile 60/40 (V/V). (T=25°C). Fractions de 500 µL..... 116
Figure 41 : Comparaison de la rétention de la cocaïne sur l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 et sur le support de contrôle lors du passage de tampon de sélection. P : percolation de 200 µL de tampon de sélection dopé par de la cocaïne (T=4°C). Lavages avec le tampon de sélection : 200 µL pour L1 et 100 µL pour L2-L9 (T=4°C)..... 117
Figure 42 : Profil d'extraction optimisé pour l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 synthétisé à partir de sepharose CNBr. Percolation : 200 µL de tampon de sélection dopé par de la cocaïne (300 ppb, T=4°C). Lavage : 300 µL tampon de sélection (T=4°C). Elution : 400 µL d'un mélange eau/acétonitrile 60/40 (V/V). (T=25°C) 118
Figure 43 : Comparaison des profils d'extractions obtenus sur l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1, le support de contrôle et le support avec l'aptamère dont la séquence a été mélangée. Procédure identique à celle de la figure 42. 119

Figure 44 : Comparaison des profils d'extractions obtenus sur l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1, le support de contrôle et le support greffé par l'aptamère dont la séquence possède une erreur. Procédure identique à celle de la figure 42. 120
Figure 45 : Courbe de capacité de l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 et de son support de contrôle synthétisés à partir de sepharose activée CNBr. 121
Figure 46 : Profil d'extraction correspondant à l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°1 synthétisé à partir de sepharose CNBr et obtenu huit mois après la synthèse. Procédure identique à celle de la figure 42. 122
Figure 47 : Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°2 synthétisé à partir de sepharose CNBr. Procédure identique à celle de la figure 42 123
Figure 48 : Courbe de capacité obtenue pour l'oligoadsorbant COC_{CNBr} n°2 synthétisé à partir de sepharose CNBr 124
Figure 49 : Profils d'élutions obtenus sur les oligoadsorbants à base d'oligonucléotides inactifs et immobilisés avec des bras espaceurs différents. V=200 µL : Percolation (cocaïne à 100 ppb). De 300 à 700 µL : lavage par le tampon de sélection 125
Figure 50 : Profils d'élution obtenus sur des oligoadsorbants synthétisés avec un espaceur C6 (COC_{CNBr} n°1) ou C12 et sur le support de contrôle 126
Figure 51 : Profil d'extraction moyen obtenu sur l'oligoadsorbant avec un espaceur C12. Procédure suivie identique à celle développée précédemment. (cf figure 42) 127
Figure 52 : Chromatogrammes correspondant à l'injection d'aptamères avec espaceur C6 ou C12. La quantité injectée correspond à l'injection de la solution de greffage diluée 125 fois (~ 8 ppm) .. 128
Figure 53 : Taux de greffages mesurés par quantification des aptamères dans les solutions de greffage et de lavage pour trois synthèses d'oligoadsorbants C6 et C12 129
Figure 54 : Courbe de capacité obtenue sur un oligoadsorbant synthétisé avec un espaceur C12 (Synthèse n°1). 130
Figure 55 : Profil d'élution pour l'évaluation du volume de fin de fixation. P : percolation de 500 µL de tampon de fixation dopé à 10 ng/L par de l'ochratoxine (T=4°C) ; L1 à L7 : lavages par 1 mL de tampon de fixation (T=4°C) ; L8 : lavage par 1 mL d'un mélange tampon de fixation/acétonitrile 90/10 (V/V). (T=4°C) ; E : élution par 1 mL d'un mélange eau/acétonitrile 90/10 (V/V) à température ambiante. 132
Figure 56 : Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant $OTA_{Strepta}$ synthétisé à partir d'agarose activée streptavidine. Percolation : 500 µL tampon de fixation dopé par le l'OTA à 1 ppb (T=4°C). Lavage : 1 mL tampon de fixation/acétonitrile 90/10 (V/V) (T=4°C). Élution, 1000 µL eau pure (T=25°C). 134
Figure 57 : Courbe de capacité de l'oligoadsorbant $OTA_{Strepta}$ et de son support de contrôle synthétisés à partir d'agarose activée streptavidine 135
Figure 58 : Profil d'élution pour l'évaluation du volume de fin de fixation. P : percolation de 100 µL de tampon de fixation dopé à 5 ng/L par de l'ochratoxine (T=4°C) ; L1 à L8 : lavages par 1 mL de tampon de fixation (T=4°C) ; E : élution par 500 µL d'un mélange eau/acétonitrile 60/40 (V/V) à température ambiante. 136
Figure 59 : Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant OTA_{CNBr} synthétisé à partir de sepharose activée CNBr. Percolation : 1 mL tampon de fixation dopé par de l'OTA à 1 ppb (T=4°C). Lavage : 1 mL tampon de fixation/acétonitrile 90/10 (V/V) (T=4°C). Élution, 500 µL eau/acétonitrile 60/40 (V/V) (T=25°C). 137
Figure 60 : Courbe de capacité de l'oligoadsorbant OTA_{CNBr} et de son support de contrôle synthétisés à partir de sepharose activée CNBr 138
Figure 61 : Constantes d'affinité mesurées en fonction de la nature et de la concentration du cation divalent utilisé. NB : aucune affinité. Adapté de [164] 140
Figure 62 : Profils d'élution de la cocaïne en fonction de la nature et de la concentration du cation divalent présent dans le tampon. (T.S. : tampon de sélection) 141
Figure 63 : Structure de la jonction de trois tiges boucles formée par deux paires G-C et une paire A-T. Les lignes pointillées symbolisent le squelette sucre-phosphate. Adapté de [278] 150
Figure 64 : Structure des molécules reconnues (1-3) et non reconnue (4) par l'aptamère anti-cocaïne 150
Figure 65 : Profil d'extraction de la quinine sur l'oligoadsorbant anti-cocaïne. Procédure identique à celle de la figure 42. 151

Figure 66 : Structure de la benzoylecgonine et profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant anti-cocaïne (pH=7,4). Procédure identique à celle de la figure 42.....152
Figure 67 : Profil d'extraction obtenu en milieu acide (pH=3). Procédure identique à celle de la figure 42 excepté le pH du tampon de sélection qui a été ajusté à 3. 152
Figure 68 : Chromatogrammes obtenus lors de l'analyse des fractions d'élution d'une extraction par un support de silice C18 (A) et par l'oligoadsorbant (B). Le pic de la cocaïne est indiqué par la flèche. 155
Figure 69 : Chromatogrammes correspondant à l'injection de sang post-mortem contenant de la cocaïne prétraité par une précipitation des protéines (A) ou une oligoextraction (B). Mode SIM. m/z = 304,1 161
Figure 70 : Courbes de capacités de l'oligoadsorbant à base d'agarose activée streptavidine avant et après le passage de l'échantillon contenant 10 % d'éthanol.....163
Figure 71 : Chromatogrammes correspondant à l'injection de vin dopé par de l'OTA (2 µg/L) non traité et traité par l'oligoadsorbant. Le temps de rétention de l'OTA est indiqué par la flèche. 164
Figure 72 : Chromatogramme correspondant à l'injection d'un échantillon de vin non dopé par de l'OTA et préalablement extrait par l'oligoadsorbant.....164
Figure 73 : Chromatogrammes issus de l'injection de vin dopé prétraité par oligoextraction non optimisée et optimisée.....165
Figure 74 : Chromatogrammes correspondant à l'extraction de l'OTA dans le vin par un oligoadsorbant, un support de silice greffée C18 et un immunoadsorbant. Vin dopé à 2 µg/L. Procédures décrites en annexe 7 167

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples d'aptamères sélectionnés et leurs constantes de dissociation. (n.r. : non renseigné). Inspiré de [162] 71
Tableau 2 : Exemples d'aptasensors. (LDD : limite de détection en milieu pur, n.r. : non renseigné) 76
Tableau 3 : Exemples de bioessais à base d'aptamères 85
Tableau 4 : Bilan des études de capacité des oligoadsorbants avec espaceur C6 synthétisés. Touts les solutions de greffage contiennent 150 µg d'aptamères.....139