



Développement d'une méthode de dosage à base d'aptamères impliquant la formation d'un complexe boucle - boucle

Benoit Chovelon

► To cite this version:

Benoit Chovelon. Développement d'une méthode de dosage à base d'aptamères impliquant la formation d'un complexe boucle - boucle. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01435343

HAL Id: dumas-01435343

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01435343>

Submitted on 13 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2015

N°

**DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DOSAGE A BASE
D'APTAMERES IMPLIQUANT LA FORMATION D'UN COMPLEXE
BOUCLE – BOUCLE**

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée à la Faculté de Pharmacie de GRENOBLE, et soutenue publiquement le 30 septembre 2015.

Benoît CHOVELON

[Données à caractère personnel]

JURY

Président : Monsieur le Professeur Patrice FAURE

MEMBRES :

Madame le Professeur Claire Demesmay

Monsieur le Professeur Eric Peyrin

Madame le Docteur Corinne Ravelet

**La faculté de pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées propres à leurs auteurs.*

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER

Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr



Doyen de la Faculté : M. le Pr. Christophe RIBUOT

Vice-doyen et Directrice des Etudes : Mme Delphine ALDEBERT

Année 2014-2015

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT**	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	D4	LAPM_UMR SNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoit	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
PU	BAKRI	Aziz	D5	TIMC-IMAG
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU-PH	BEDOUCHE	Pierrick	D5	ThEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	BELLET	Béatrice	D5	-
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	BOURGOIN	Sandrine	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
MCU	BRETON	Jean	D1	L.C.I.B. - UMR E3 CEA/UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	D4	IBS
PU	BURMEISTER	Wim	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoit	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
Professeur Emérite	CALOP	Jean	D5	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	D1	LAPM
MCU	CHOISNARD	Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU-PH	CORNET	Murielle	D4	THEREX, TIMC-IMAG
PU-PH	DANEL	Vincent	D5	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	DELETRAZ-DELPORTE	Martine	D5	Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128) UCB

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER

Lanto.Faure@ujf-grenoble.fr



MCU	DEMEILLIERS	Christine	D1	LBFA, Inserm U1055
PU	DROUET	Christian	D4	AGIM - CNRS 3405
PU	DROUET	Emmanuel	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	DURMORT-MEUNIER	Claire	D1	I.B.S
PU-PH	FAURE	Patrice	D1	HP2-Inserm U1042
PRCE	FITE	Andrée	D6	-
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	D3	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GILLY	Catherine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	D5	HP2-Inserm U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	D6	-
Professeure Emérite	GRILLOT	Renée	D4	-
MCU	GROSSET	Catherine	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GUIEU	Valérie	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	HININGER-FAVIER	Isabelle	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	KHALEF	Nawel	D5	TIMC-IMAG
MCU	KRIVOBOK	Serge	D3	IRTSV
PU	LENORMAND	Jean Luc	D1	THEREX, TIMC-IMAG
PU	MARTIN	Donald	D1	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF-CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	D4	L.E.C.A
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	D4	THEREX, TIMC-IMAG
MCU	MOUHAMADOU	Bello	D3	L.E.C.A
MCU	NICOLLE	Edwige	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	OUKACINE	Farid	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PERES	Basile	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PEUCHMAUR	Marine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	PEYRIN	Éric	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	RACHIDI	Walid	D1	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

MCU	RAVELET	Corinne	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	RIBUOT	Christophe	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	RIEU	Isabelle	D5	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	Anne -Marie	D1	-
PU-PH	SEVE	Michel	D1	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	SOUARD	Florence	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
PAST	TROUILLER	Patrice	D5	-
MCU	VANHAVERBEKE	Cécile	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	WOUESSIDJEW	Denis	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063

**** D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements (DMBMT) »**

D2 : Département « Bases Physicochimiques du Médicament »

D3 : Département « Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments » (O3-PAM)

**D4 : Département « Bases immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et
Médicaments associés »**

D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »

D6 : Département « Anglais »

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche Institut
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
et de Cognition et Ontogénèse »
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
LAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogénèse
IPB :
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Roget
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MCU : Maîtres de Conférences des Universités
MCU-PH : Maîtres de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeurs des Universités
PU-PH : Professeurs des Universités et Praticiens Hospitaliers
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR : Unité Mixte de Recherche
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

REMERCIEMENTS

Cette thèse n'aurait pas été réalisable sans la collaboration étroite entre **Monsieur le Professeur Patrice Faure** responsable du Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie (CHU de Grenoble) et **Monsieur le Professeur Eric Peyrin** directeur du Département de Pharmacochimie Moléculaire et responsable de l'équipe NOVA. Merci de m'avoir permis de réaliser ce travail qui a été décisif pour mon avenir professionnel.

Je voudrais remercier **Monsieur le Professeur Patrice Faure** de me faire l'honneur de présider mon jury.

Je tiens à remercier très sincèrement **Monsieur le Professeur Eric Peyrin**, de m'avoir accordé sa confiance en m'accueillant au DPM. Sa sympathie, nos discussions sur l'internat en biologie médicale, les gardes...et son goût prononcé pour le sport de compétition m'ont mis tout de suite à l'aise.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à **Madame le Docteur Corinne Ravelet**, directeur de thèse, pour m'avoir encadré dans ce travail. Je voudrais la remercier pour ses nombreux conseils dans les choix de protocoles, pour son soutien actif (notamment dans les fins de manip...) et pour sa patience. Mon travail m'a été facilité par sa disponibilité, sa gentillesse et sa bonne humeur quotidienne.

Je remercie **Madame le Professeur Claire Demesmay**, d'avoir accepté de juger ce travail et d'être membre de ce jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier Emmanuelle Fiore (technicienne) et Emma Goux (doctorante) qui m'ont accompagné dans mes manip. Leur bonne humeur et les talents d'Emma en tant que DJ sont appréciables !

Ces premiers pas dans le monde de la recherche m'ont été facilités par la disponibilité de l'ensemble des membres du DPM. Je voudrais les remercier pour leur accueil chaleureux.

Je voudrais également remercier l'ensemble des membres du DBTP et notamment mes co-internes qui ont su me faciliter la tâche en particulier ces dernières semaines avec des emplois du temps parfois évolutifs...

Je finirai par remercier les membres de ma famille. Je voudrais les remercier pour toutes les marques d'entraide et de soutien qu'ils ont su me manifester ces dernières années. Merci plus particulièrement à mes parents, de m'avoir aidé tout au long de mes études.

Enfin je voudrais remercier Armelle. Merci pour ton soutien dans les bons moments comme dans ceux plus difficiles.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	08
INTRODUCTION	10
PREMIÈRE PARTIE : BIBLIOGRAPHIE	11
1. IMMUNOANALYSE.....	12
1. <i>Immunoanalyse sans marqueur</i>	12
1.1 <i>Immunoprécipitation en milieu gélifié</i>	13
1.2 <i>Immunoprécipitation en milieu liquide</i>	14
2. <i>Immunoanalyse avec marqueur</i>	15
2.1 <i>Méthodes à une seule reconnaissance</i>	15
2.2 <i>Méthodes à double reconnaissance</i>	18
3. <i>Immunoanalyse au sein du Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie (DBTP), IBP, CHU Grenoble</i>	20
2. LES APTAMERES : OUTILS DE RECONNAISSANCE MOLECULAIRE.....	22
1. <i>Rappels sur les acides nucléiques</i>	22
1.1 <i>Composition</i>	22
1.2 <i>Taille</i>	24
1.3 <i>Structure</i>	25
2. <i>Sélection par la méthode SELEX</i>	28
3. <i>Anticorps versus Aptamères</i>	31
4. <i>Complexe kissing et principe du design de l'aptaswitch en vue d'un dosage à double reconnaissance</i>	32
5. <i>Intérêts du Blocking Agent (BA)</i>	34
DEUXIÈME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE	35
1. INTRODUCTION DU SUJET.....	36
2. MATERIEL ET METHODES.....	39
3. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	43
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	54
RESUME	56
SERMENT DE GALIEN	58
ANNEXE 1 (Immunoanalyse sans marqueur)	59
ANNEXE 2 (Immunoanalyse avec marqueur)	60
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	62

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CPG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

IA : Immunoanalyse

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

AMM : Autorisation de mise sur le marché

DBTP : Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie

CI : Complexe immun

CRP : Protéine C réactive

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer (Transfert Résonnant d'Energie de Fluorescence)

LOCI : Luminescent Oxygen Channeling Immunoassay

EMIT : Enzyme Multiplied Immunoassay Technique

TRACE : Time Resolved Amplified Cryptate Emission

PTH : Parathormone

AFP : alpha-foeto-protéine

SELEX : Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment

Da : Dalton

b : bases

pb : paires de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

K_d : Constante de dissociation

HRP : Horseradish peroxidase (peroxydase de raifort)

BA : Blocking agent

ELAA : Enzyme-linked aptamer assay

ELAKCA : Enzyme-linked aptamer kissing complex assay

BSA : Albumine de sérum bovin

SA – HRP : Peroxydase de raifort couplée à la streptavidine

TMB : Tétraméthylbenzidine

HPLC : High performance liquid chromatography (chromatographie en phase liquide à haute performance)

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

UV : Ultraviolet

NOS : N-Oxysuccinimide

LD : Limite de détection

RNase : Ribonucléase

DNase : Désoxyribonucléase

PETINIA : Particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay

Rapport S/B : Rapport Signal / Bruit

INTRODUCTION

La biologie médicale est en constante évolution et est à la recherche de méthodes robustes, peu coûteuses, automatisables et disposant de haute cadence. Le lithium, par exemple dont la technique de dosage de choix est la photométrie de flamme, est aujourd'hui très souvent analysé par complexométrie, ce qui permet son automatisation sur un analyseur multiparamétrique de biochimie. De même le cortisol plasmatique dont la technique de dosage de référence est la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) est dosé dans la majorité des laboratoires par immunoanalyse (IA), méthode plus simple à mettre en œuvre. L'IA permet d'envisager le dosage, via la liaison antigène-anticorps, de toutes molécules disposant d'au moins un épitope.

Au cours des cinquante dernières années, les progrès dans l'automatisation, la production d'anticorps monoclonaux ainsi que le marquage d'anticorps ont permis un développement considérable de cette discipline. Nous verrons un peu plus loin les différents immunodosages existants ainsi que les limites de ces méthodologies pour les molécules de petite taille.

Dans le but d'apporter une solution à ces limitations nous avons envisagé un dosage de petites molécules en utilisant des aptamères comme outil de reconnaissance moléculaire (1). Les aptamères sont des oligonucléotides en série ADN ou ARN ayant la faculté de reconnaître spécifiquement une cible (2). Ils peuvent être dotés d'une activité catalytique (3) (alkylation, acylation, ligation d'ARN...), voire inhiber une fonction catalytique (aptamère anti Rev, Tat, transcriptase inverse du VIH1). Assez récemment un aptamère thérapeutique a été commercialisé. Il s'agit du pegaptanib commercialisé sous le nom de Macugen®, indiqué dans certaines formes de dégénérescence maculaire liée à l'âge (AMM européenne : 31 janvier 2006). Les aptamères, par leur faculté à reconnaître spécifiquement une cible, entrent en concurrence avec les anticorps depuis quelques années en particulier dans le domaine du diagnostic.

PREMIERE PARTIE : BIBLIOGRAPHIE

1. IMMUNOANALYSE

La réaction entre un anticorps et un antigène est une réaction réversible impliquant des liaisons faibles (hydrogène, effet hydrophobe, électrostatique, Van der Waals) (4) :



Les méthodes de dosage exploitant la réaction anticorps – antigène présentent de fortes similitudes avec celles utilisant des aptamères (reconnaissance moléculaire de la cible, équilibre réactionnel régi par la loi d'action de masse, détection colorimétrique possible...). Un état des lieux des méthodes d'IA existantes ainsi que celles utilisées au Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie a été dressé. Cela permettra de mieux comprendre les limites de ces dosages et l'intérêt des aptamères.

1. Immunoanalyse sans marqueur

Il s'agit des techniques les plus anciennes uniquement basées sur la formation de complexes immuns (CI). La figure 1 illustre le comportement des CI lors de l'ajout d'un antigène à un sérum contenant l'anticorps dirigé contre cet antigène.

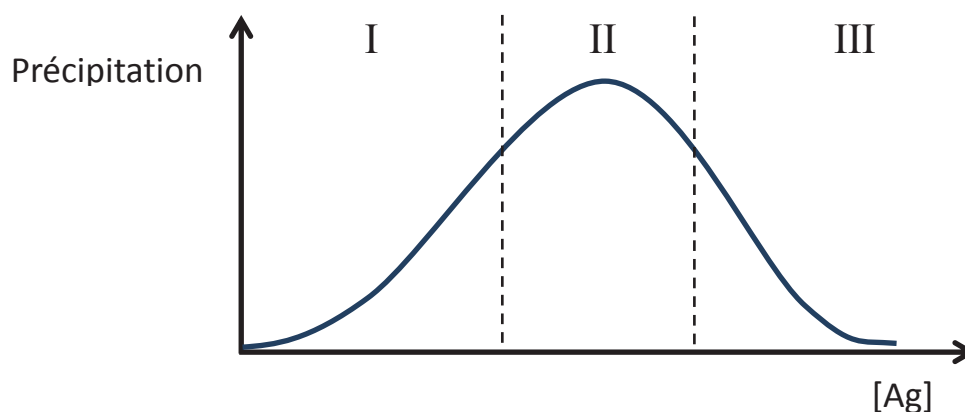


Figure 1 : Immunoprécipitation des CI

Dans la partie ascendante (I), toute addition d'antigène entraîne l'augmentation de la taille des CI qui sont alors solubles. Dans la zone d'équivalence (II), les concentrations d'anticorps et d'antigène sont proches, les CI ont atteint leur taille maximale, ils précipitent. En large excès d'antigène (III), la taille des CI diminue, ils sont à nouveau solubles (5).

1.1 Immunoprécipitation en milieu gélifié

Ces méthodes sont principalement qualitatives. L'anticorps et l'antigène sont introduits en des points différents d'un milieu gélifié. Ils vont diffuser l'un vers l'autre et vont précipiter lorsqu'ils seront en concentration équivalente (formation de CI maximale). Le précipité peut se solubiliser en cas d'excès d'antigène ou d'anticorps, c'est le phénomène de zone (6).

Exemple de la Méthode d'Ouchterlony : diffusion de l'antigène et de l'anticorps déposés dans les puits, dans toutes les directions. Il y a formation d'un arc lorsqu'antigène et anticorps sont en concentrations équivalentes (figure 2).

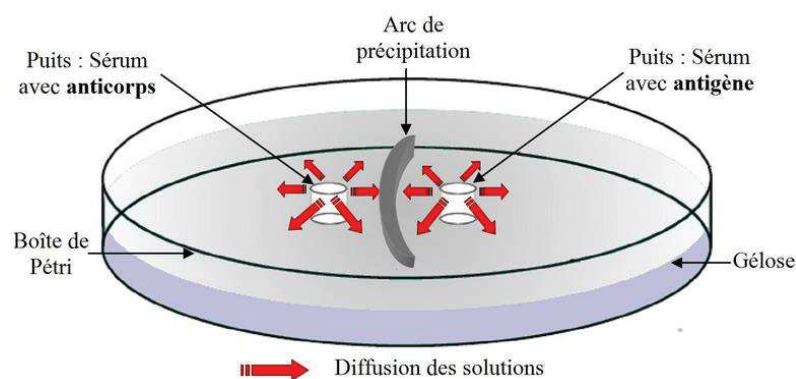


Figure 2 : Méthode d'Ouchterlony (7)

1.2 Immunoprécipitation en milieu liquide

Il s'agit de méthodes quantitatives permettant le dosage de protéines en concentration suffisante ($> 1 \text{ mg/L}$) : CRP, Immunoglobulines, albumine, transferrine... Les dosages se déroulent dans la partie ascendante de la courbe d'immunoprécipitation. La concentration de CI va augmenter lorsque celle d'antigène augmente. Les CI ont la capacité de diffuser ou d'absorber une lumière incidente. Ainsi plus la concentration d'antigène est forte, plus la diffusion et l'absorption du rayon incident vont être importantes (5). Il existe un biais par défaut si on sort de la zone ascendante lorsqu'on est en excès d'antigène (zone III).

Il existe deux méthodes de détection (figure 3) :

- Turbidimétrie = mesure de l'intensité de la lumière transmise (dans l'axe de la lumière incidente) \approx mesure du trouble
- Néphélométrie = mesure de l'intensité de la lumière diffusée (le détecteur est généralement placé à 90° du faisceau incident)

Les techniques néphélométriques présentent généralement des limites de détection inférieures aux techniques turbidimétriques.

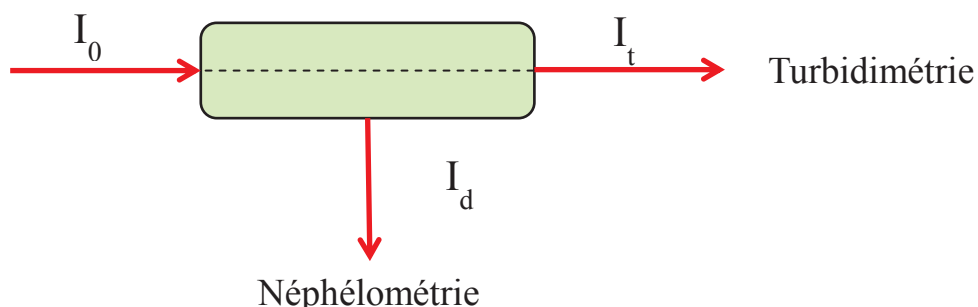


Figure 3 : Turbidimétrie / Néphélométrie

2. Immunoanalyse avec marqueur

En immunoanalyse, un marqueur est une entité liée soit à l'antigène, soit à l'anticorps, qui délivrera un signal quantifiable (4). Ce marqueur peut-être un radioélément, une enzyme ou un luminophore. Bien que les dosages d'anticorps soient possibles, la classification de ces techniques sera limitée aux dosages d'antigènes.

Les techniques en phase hétérogène nécessitent la fixation sur un support solide (puits, billes, particules aimantées...) d'un anticorps ou d'un antigène ainsi que des étapes de séparation. En phase homogène, le dosage a lieu en solution sans étape de séparation, ce qui permet un gain de temps considérable. C'est la réaction antigène – anticorps qui entrainera la modulation du signal (4).

2.1 Méthodes à une seule reconnaissance

Ces techniques sont utilisées lorsque l'antigène ne dispose que d'un seul épitope ou lorsque seul un anticorps peut se fixer sur l'antigène sans perturber la fixation d'un deuxième anticorps. Dans la pratique il s'agit de techniques de dosage de petites molécules.

On utilise le phénomène de compétition entre l'antigène analyte et un antigène marqué ou immobilisé, vis à vis d'un anticorps. Dans la majorité des cas le signal mesuré sera inversement proportionnel à la concentration d'antigène (figure 4).

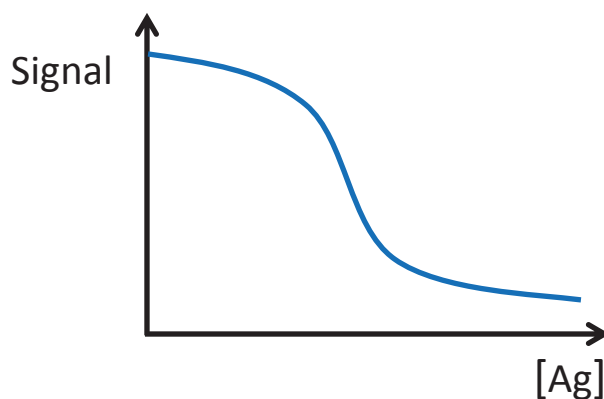


Figure 4 : Relation inverse signal – [Ag]

- **Techniques en phase hétérogène**

Exemple 1 : Méthode avec anticorps marqué (figure 5)

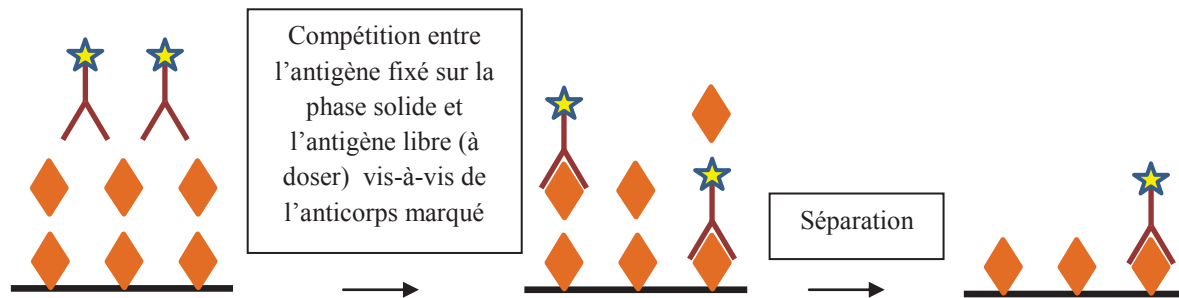


Figure 5 : Méthode avec antigène immobilisé

Exemple 2 : Méthode avec antigène marqué (figure 6)

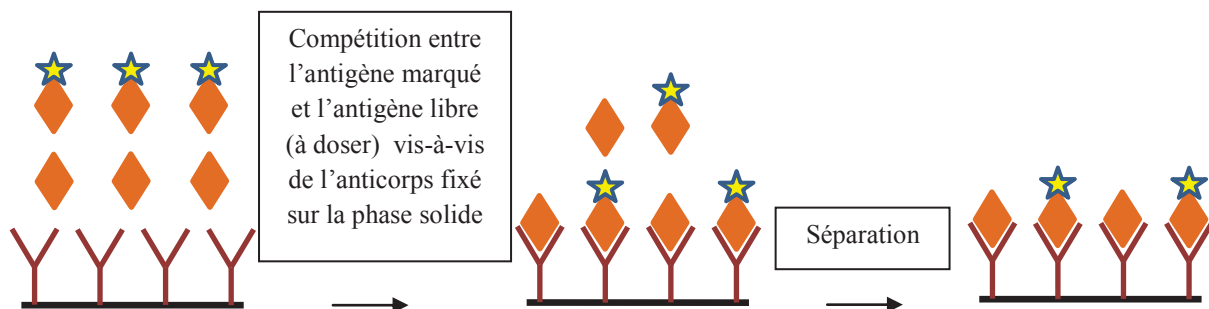


Figure 6 : Méthode avec anticorps immobilisé

Le dosage du cortisol sur les automates SIEMENS Centaur, fait appel à ce type de technique (annexe 2). Le cortisol de l'échantillon entre en compétition avec le cortisol marqué à l'ester d'acridinium vis-à-vis d'un anticorps présent sur la phase solide (particules paramagnétiques). La séparation par magnétisme est suivie d'un lavage à l'eau désionisée. L'ajout de peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin déclenche la réaction de chimiluminescence (4).

- **Techniques en phase homogène**

La liaison antigène – anticorps va moduler l'activité du ou des marqueurs.

Exemple 1 : Méthode avec anticorps et antigène marqués par des fluorophores (figure 7)

Cette méthode est basée sur le transfert résonnant d'énergie de fluorescence (FRET). Le premier fluorophore est excité par un photon et transmet son énergie au deuxième fluorophore qui va émettre à une longueur d'onde λ différente du premier. Le transfert d'énergie est inversement proportionnel à la puissance 6 de la distance entre les deux fluorophores (4).

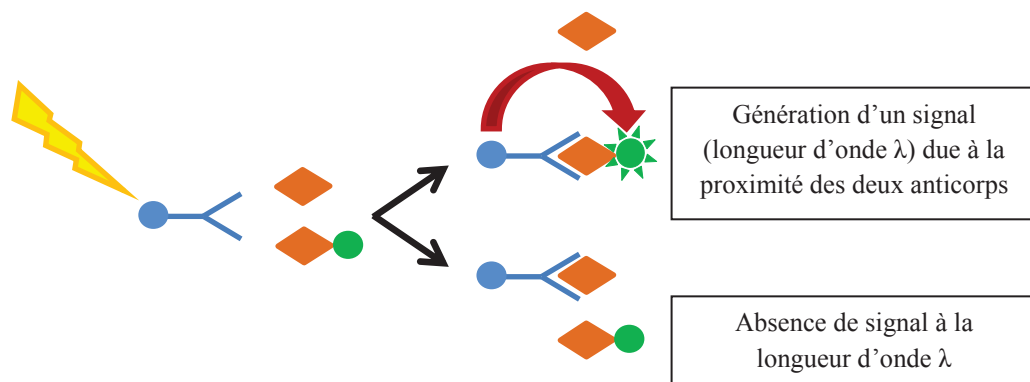


Figure 7 : Principe méthode à une seule reconnaissance basée sur le FRET

Exemple 2 : Méthode avec antigène marqué par une enzyme (figure 8)

L'activité de l'enzyme (présente sur l'antigène) est modulée par la liaison à l'anticorps. L'activité peut être diminuée par liaison à l'anticorps en raison d'encombrement stérique mais l'inverse (augmentation de l'activité) est également possible suivant l'enzyme utilisée pour le marquage. Les méthodes EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) très utilisées en pharmacologie-toxicologie (annexe 2) utilisent ces systèmes.

Cas d'une enzyme dont l'activité augmente lors de la fixation à l'anticorps :

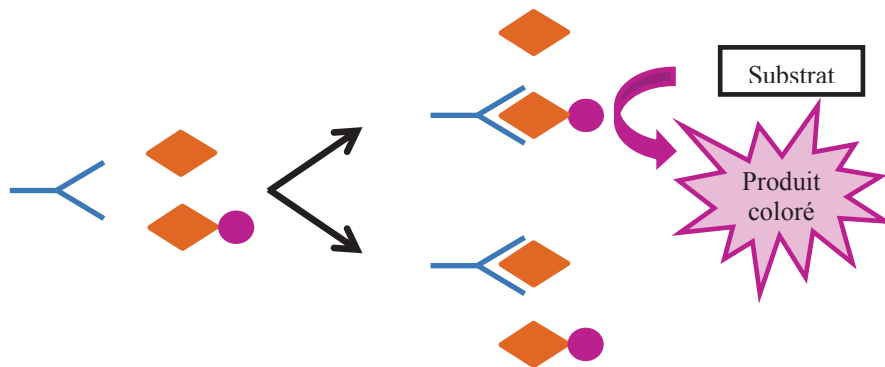


Figure 8 : Principe méthode EMIT

2.2 Méthodes à double reconnaissance

Formation d'un « sandwich » par fixation de deux anticorps sur l'antigène à doser. Cela nécessite l'existence de deux sites épitopes (masse molaire de l'antigène d'au moins 3000 g/mol).

Ces techniques permettent d'accroître la spécificité (pour interférer, une molécule doit contenir les deux épitopes) et de diminuer la limite de détection.

• Techniques en phase hétérogène (figure 9)

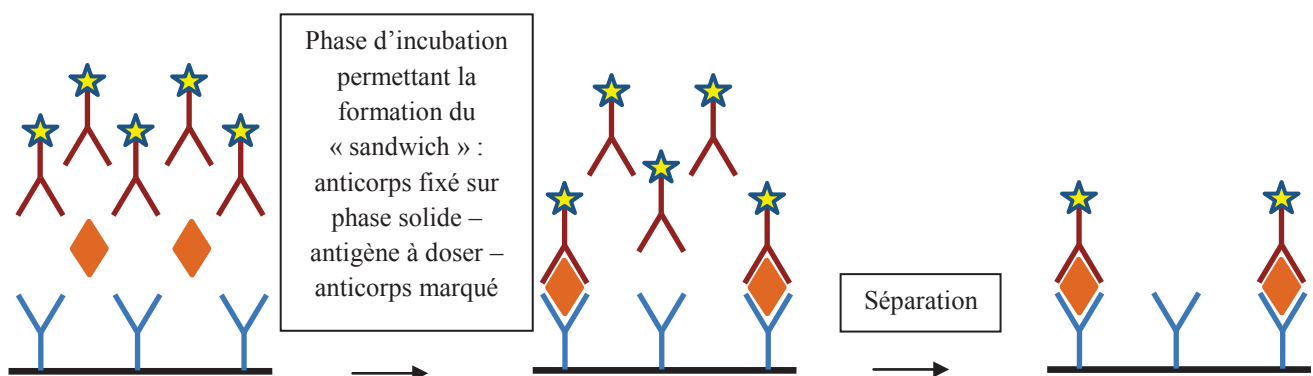


Figure 9 : Principe méthode ELISA sandwich en phase hétérogène

Après la séparation, on procède à la révélation du système qui dépendra de la nature du marqueur.

Les dosages de la parathormone (PTH) et de l'alpha-foeto-protéine (AFP) sur les automates SIEMENS Centaur (annexe 2) utilisent ce type de technique, avec un premier anticorps fixé par covalence à des billes paramagnétiques et un second marqué à l'ester d'acridinium.

- **Techniques en phase homogène (figure 10)**

Comme pour les méthodes à une seule reconnaissance, la formation du sandwich anticorps – antigène – anticorps va moduler l'activité du ou des marqueurs.

Exemple : Méthode avec anticorps et antigène marqués par des fluorophores

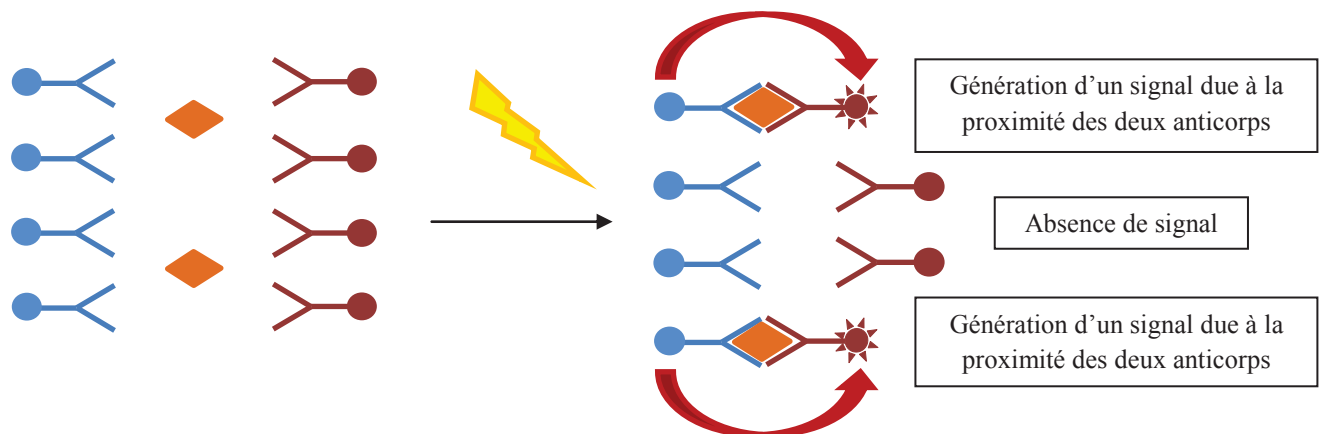


Figure 10 : Principe méthode à double reconnaissance basée sur le FRET

La proximité des deux anticorps, lorsqu'ils seront fixés à l'antigène va permettre le transfert résonnant d'énergie de fluorescence (FRET). La technique TRACE (automates THERMOSCIENTIFIC Kryptor) (annexe 2) utilise ce système.

3. Immunoanalyse au sein du Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie (DBTP), IBP, CHU Grenoble

Les immunodosages représentent une part importante de l'activité du DBTP. Ils sont réalisés principalement sur quatre automates (hors RadioImmunoAnalyse) :

- SIEMENS Analyseur Dimension Vista
- SIEMENS Analyseur ADVIA Centaur XP
- SIEMENS BN ProSpec
- THERMOSCIENTIFIC Kryptor

Une liste des principaux paramètres réalisés en IA au DBTP a été établie (annexes 1 et 2). Le cortisol fait partie des nombreux paramètres de la liste, dosé par une technique à une seule reconnaissance (compétition). Cette hormone sécrétée par les surrénales a une structure stéroïdienne. Son dosage à 8h du matin est un élément du diagnostic d'insuffisance surrénale. A l'inverse, la cortisolémie à 24h (minuit) permet de diagnostiquer des syndromes de Cushing (hypercorticisme).

Les résultats de l'étude de spécificité (présents sur la fiche technique du test) indiquent des pourcentages de réactivité croisée importants pour certains stéroïdes de synthèse :

- Prednisolone (50 µg/dl) \leq 120 %
- Prednisone (100 µg/dl) \leq 35 %
- 6-méthyl-prednisolone (100 µg/dl) \leq 30 %

Cette importante réactivité croisée s'explique par l'existence d'une forte homologie structurale entre ces molécules. Par exemple, prednisolone et cortisol ne diffèrent que par une double liaison (figure 11).

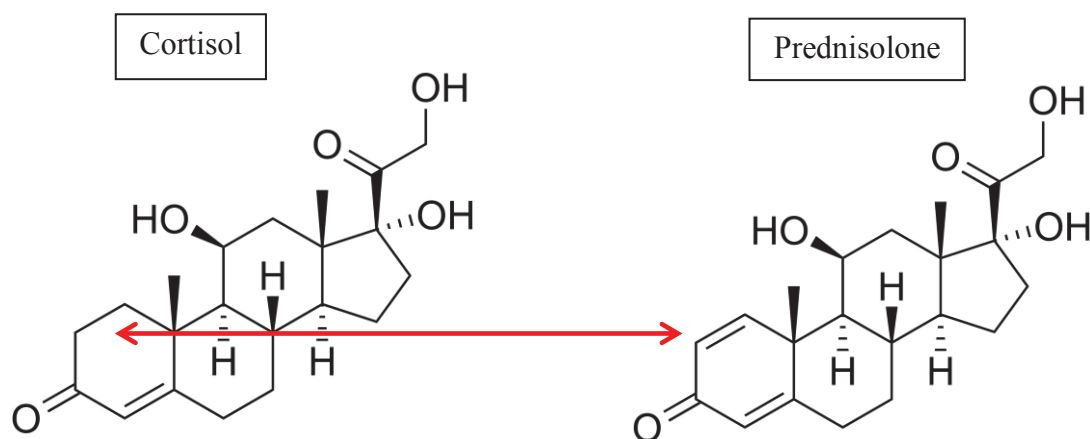


Figure 11 : Comparaison cortisol / prednisolone

La prednisolone (Solupred®, Hydrocortancyl®), la prednisone (Cortancyl®) et la 6-méthylprednisolone (Medrol®, Solumedrol®) sont des corticoïdes de synthèse utilisés pour leur action anti-inflammatoire. Ces médicaments sont omniprésents en milieu hospitalier. Le dosage du cortisol chez un patient traité par un de ces corticoïdes de synthèse sera donc surestimé.

C'est dans le but de trouver des solutions à ce manque de spécificité des immunodosages à une seule reconnaissance pour petites molécules, que nous avons travaillé sur des aptamères modifiés, pouvant former des complexes kissing avec d'autres oligonucléotides en forme d'épingle à cheveux.

2. LES APTAMERES : OUTILS DE RECONNAISSANCE MOLECULAIRE

Les Aptamères sont des oligonucléotides simples brins en série ARN ou ADN ayant été sélectionnés par méthode SELEX (Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment) (8) pour se lier avec une forte affinité et de manière spécifique à une cible prédésignée (2).

1. Rappels sur les acides nucléiques

Il existe deux types d'acides nucléiques : l'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'acide ribonucléique (ARN). L'ADN est le support de l'information génétique. Il porte l'ensemble du génome nucléaire des cellules eucaryotes. Les ARN possèdent de nombreux rôles *in vivo*. Il en existe différents types, les plus connus, ARN messagers (ARNm), ARN de transfert (ARNt) et ARN ribosomique (ARNr) interviennent dans la synthèse des protéines.

1.1 Composition

Les acides nucléiques sont des polymères dont l'unité de base est le nucléotide.

Un nucléotide est constitué d'un pentose lié en 1' à une base azotée et en 5' à un, deux ou trois groupements phosphate. L'assemblage pentose + base azotée constituant le nucléoside.

Les bases azotées sont classées en deux groupes (figure 12) :

- Les bases pyrimidiques
- Les bases puriques

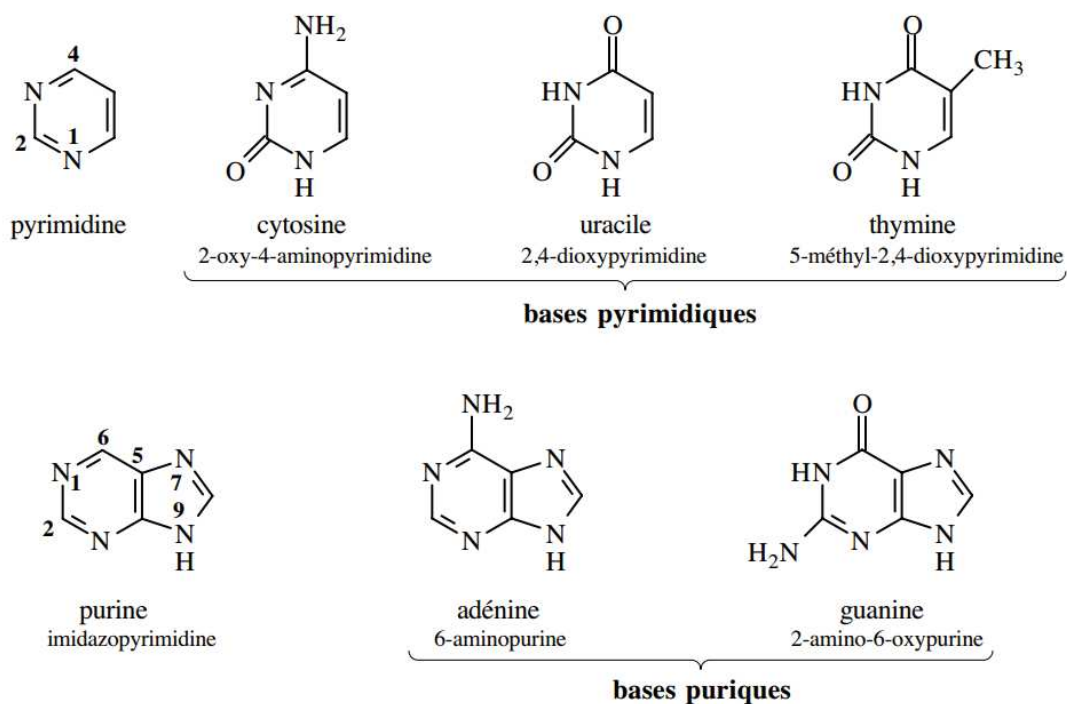


Figure 12 : Bases puriques et bases pyrimidiques (9)

C'est le groupement phosphate qui permettra via une liaison 3'-5' phosphodiester la polymérisation des nucléotides pour former un acide nucléique (figure 13) :

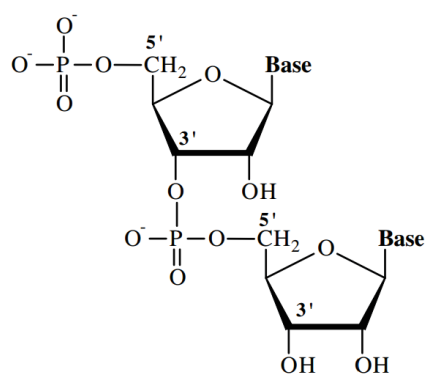


Figure 13 : Acide nucléique (9)

Le pentose est le 2-déoxy-D-ribose dans le cas de l'ADN et un D-ribose dans le cas de l'ARN (figure 14).

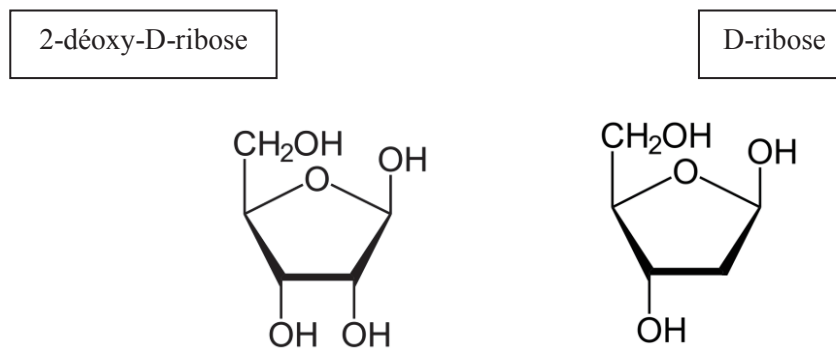


Figure 14 : Pentoses des acides nucléiques

1.2 Taille

Les acides nucléiques sont des macromolécules. Leur taille est en général exprimée :

- Soit par leur masse moléculaire : Dalton (Da)
- Soit par leur nombre de nucléotides : bases (b) ou paires de bases (pb) pour les molécules doubles brins

In vivo l'ADN est bicaténaire et peut-être constitué de centaines de millions de paires de bases (environ 220 millions de paires de bases pour le chromosome 1). En revanche les molécules d'ARN sont en général monocaténaires et de taille plus restreintes (quelques dizaines à plusieurs milliers de bases).

1.3 Structure

Un acide nucléique est décrit en premier lieu par sa structure primaire. Il s'agit de la séquence de nucléotides définissant le polymère.

La structure secondaire des acides nucléiques est due en grande partie à la faculté des bases azotées à former des appariements canoniques type « Watson-Crick ».

Il s'agit d'appariements entre bases complémentaires par le biais de liaisons hydrogène (figure 15).

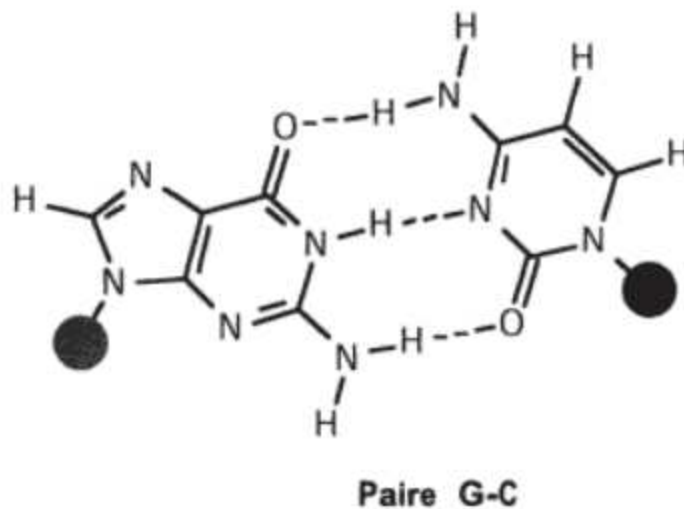


Figure 15 : Exemple de l'appariement guanine – cytosine (10)

Les appariements $G \equiv C$ impliquent la formation de trois liaisons hydrogène. Ils sont donc plus stables que les appariements $A = T$ (ADN) et $A = U$ (ARN), n'en impliquant que deux.

In vivo, l'ADN existe principalement sous la forme d'une double hélice via des appariements « Watson-Crick » entre deux brins complémentaires (appariements inter-caténares). Il s'agit de la structure tertiaire de l'ADN appelée également arrangement suprahélicoïdal. A l'inverse, l'ARN va le plus souvent réaliser des appariements intra-caténares, ce qui va générer des motifs structuraux (11) :

- Tige-boucle ou épingle à cheveux ou hairpin (figure 16)

Deux domaines complémentaires d'un même brin s'apparient. Les nucléotides entre les deux régions forment une boucle. Les boucles trop courtes ou trop grandes rendent la structure instable. La taille optimale de la boucle est de 5 à 8 nucléotides.

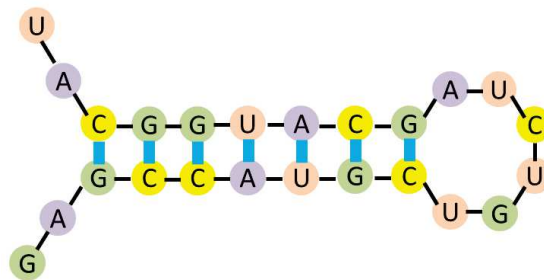


Figure 16 : Représentation schématique d'une épingle à cheveux

- Pseudo-nœud

Il s'agit d'une structure en tige-boucle dont certains nucléotides de la boucle vont s'apparier avec une autre région du brin d'ARN, distincte de la tige (figure 17).

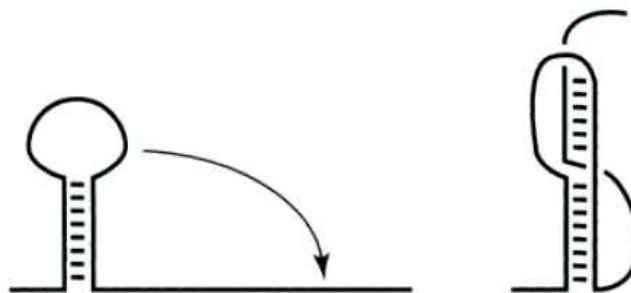


Figure 17 : Représentation schématique d'un pseudo-nœud (10)

- Tétrade de G ou G-Quadruplex

Cette structure repose sur des appariements de type Hoogsteen avec rapprochement de quatre guanines dans un plan cyclique pour former une structure en plateau. A noter la présence d'un cation monovalent au centre des quatre guanines, stabilisant la structure. Les G-Quadruplex sont formés par l'empilement de plusieurs structures planes (figure 18).

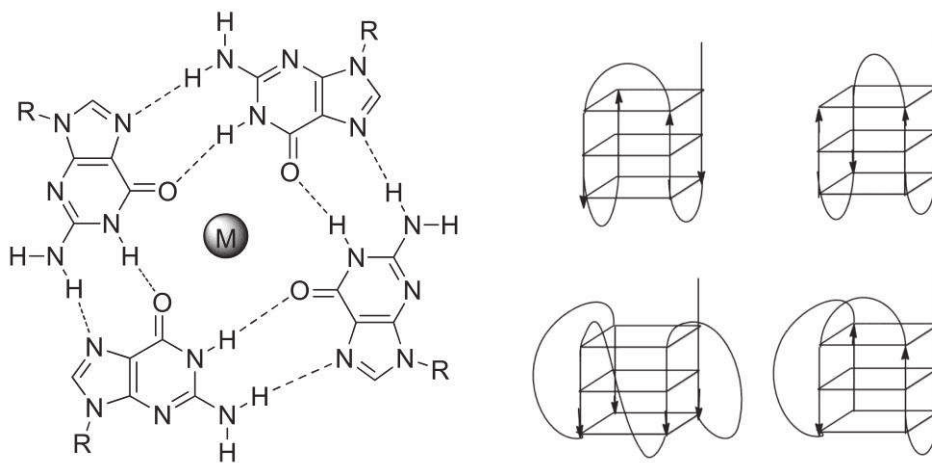


Figure 18 : Représentation schématique d'un G-Quadruplex (12)

2. Sélection par la méthode SELEX

La méthode SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) (8) est basée sur une approche combinatoire (figure 19). Il s'agit tout d'abord de disposer d'une banque d'oligonucléotides contenant environ 10^{15} séquences. La cible (pour laquelle on veut développer un aptamère) va être placée au contact de cette banque. La fixation sur la cible implique des liaisons faibles ainsi qu'un changement de structure et/ou de conformation de l'aptamère. Les cibles sont très hétérogènes en taille : cellules, virus, protéines, médicaments, toxines, cations métalliques...

La diversité structurale des oligonucléotides étant considérable, nous pouvons considérer que de nombreuses séquences réussiront à reconnaître la cible. Il s'agit ensuite de séparer les oligonucléotides libres de ceux liés à la cible. Il existe pour cela différentes techniques dont l'électrophorèse capillaire (utilisée au Département de Pharmacochimie Moléculaire) et la chromatographie d'affinité. On réalise à la fin de chaque cycle une amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) des oligonucléotides ayant reconnu la cible.

Dix à quinze cycles de sélection seront réalisés au cours desquels les conditions telles que le pH, la température, la force ionique et la concentration en cible d'intérêt seront modifiées dans le but de sélectionner les séquences ayant une forte affinité pour cette dernière.

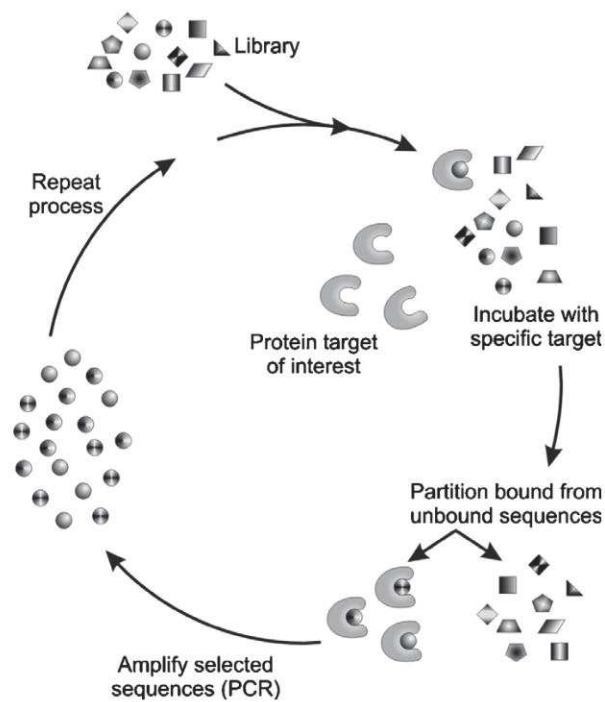


Figure 19 : Principe de la méthode SELEX (13)

La méthode SELEX permet de sélectionner des aptamères reconnaissant spécifiquement et avec une forte affinité leur cible.

L'affinité d'un aptamère vis-à-vis de sa cible représente sa faculté à interagir fortement avec elle. Elle est évaluée par la constante de dissociation K_d qui est la constante d'équilibre de la réaction : Aptamère – Cible \rightleftharpoons Aptamère + Cible

D'après la loi d'action de masse, nous avons :

$$K_d = \frac{[Aptamère] \times [Cible]}{[Aptamère - Cible]}$$

Ainsi plus l'affinité d'un aptamère pour sa cible est importante, plus sa constante de dissociation sera petite. Le challenge de sélectionner un aptamère présentant une forte affinité est d'autant plus difficile que la molécule est de petite taille. En effet plus la cible présente

une taille importante, plus il y aura de liaisons possibles permettant une bonne interaction cible - aptamère.

Quelques exemples de K_d (11) :

Cibles	Acide nucléique	K_d	Références bibliographiques
Zn^{2+}	ARN	1,2 mM	(14)
Adénosine	ADN	6 μ M	(15)
Théophylline	ARN	100 nM	(16)
Vasopressine	ARN	\approx 1 nM	(17)
Transcriptase inverse du VIH-1	ADN	\approx 1 nM	(18)
Immunoglobuline E	ADN	10 nM	(19)

La spécificité représente la faculté de l'aptamère à reconnaître uniquement la cible et à ne pas se lier à d'autres molécules. Elle peut être évaluée par le calcul du pourcentage de réactivité croisée :

$$\% \text{ de réactivité croisée} = \frac{[\text{Concentration d'analyte}]_2 - [\text{Concentration d'analyte}]_1}{[\text{Concentration du composé ajouté}]} \times 100$$

Avec :

$[\text{Concentration d'analyte}]_2$ = concentration d'analyte mesurée dans l'échantillon enrichi

$[\text{Concentration d'analyte}]_1$ = concentration d'analyte mesurée dans l'échantillon non enrichi

3. *Anticorps versus Aptamère*

Les aptamères constituent une alternative intéressante aux anticorps pour le développement de nouvelles méthodes d'analyse basées sur la reconnaissance moléculaire de la cible. Les principaux avantages des aptamères sont résumés dans ce tableau (1) :

	Anticorps	Aptamère
Production	Synthèse biologique, coût important, processus long	Synthèse chimique à faible coût, rapide
Reproductibilité	Variation d'un lot à un autre	Très reproductible en raison du mode de synthèse
Cible	Limitée aux molécules immunogènes	Très variée (ions métalliques, petites molécules, protéines, cellules...)
Sensibilité à la température	Dénaturation irréversible	Dénaturation réversible
Toxicité	Protéines immunogènes	Faible immunogénicité et toxicité

4. Design de l'aptaswitch (20) en vue d'un dosage à double reconnaissance

Lorsqu'un aptamère reconnaît sa cible, il change de structure et / ou de conformation pour interagir pleinement avec celle-ci. Les complexes aptamère – cible sont principalement stabilisés en tige-boucle, pseudo-nœud et tétrade de G.

Pour concevoir l'aptaswitch, seuls les aptamères s'organisant en tige-boucle au contact de la cible, avec formation au niveau apical d'une boucle n'intervenant pas dans la reconnaissance de la cible, vont être utilisés (figure 20).

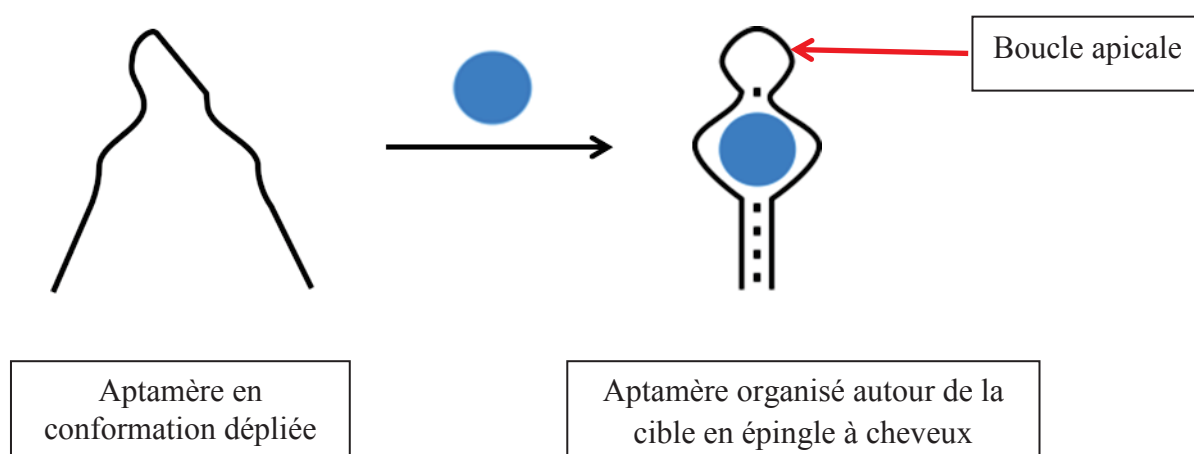


Figure 20 : Changement de conformation de l'aptamère au contact de la cible

La boucle apicale de ces aptamères peut être substituée par une séquence d'ARN capable d'interagir avec un deuxième oligonucléotide organisé en tige-boucle, grâce à une interaction boucle – boucle appelée complexe kissing. Les bases des deux boucles se lient grâce à des appariements de type « Watson-Crick ». L'affinité aptamère – cible n'est en principe pas (ou est peu) perturbée puisqu'il s'agit de nucléotides n'intervenant pas dans la reconnaissance de la cible. L'aptamère modifié changeant de conformation en présence de cible est appelé

aptaswitch, l'oligonucléotide organisé en épingle à cheveux est lui dénommé aptakiss (figure 21).

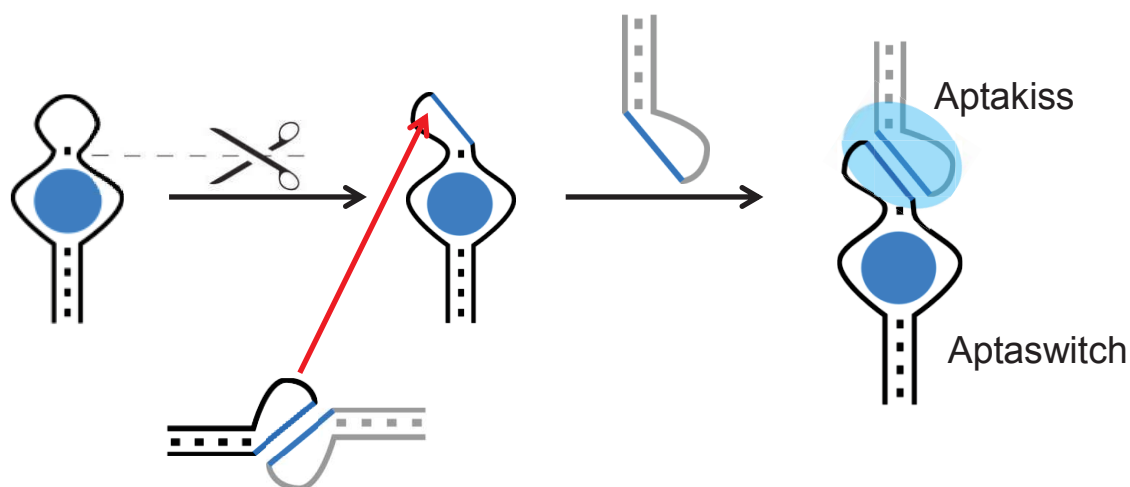


Figure 21 : Design aptaswitch

En introduisant un marqueur (fluorophore, enzyme...) sur l'aptakiss on pourra réaliser un essai pour petites molécules avec double reconnaissance : cible reconnue par l'aptaswitch et complexe cible – aptaswitch reconnu par l'aptakiss via l'interaction boucle – boucle. Il a été décrit un marquage de l'aptakiss avec un fluorophore, le Texas Red, avec détection en anisotropie de fluorescence lors d'un essai en phase homogène (20).

Pour ma part, j'ai travaillé sur un système en phase hétérogène, impliquant l'immobilisation de l'aptaswitch sur une phase solide (puits Corning®). L'aptakiss biotinylé pourra fixer l'enzyme (peroxydase de raifort, HRP) elle-même couplée à la streptavidine, ce qui permet l'amplification du signal. Dans le but d'accroître le rapport Signal / Bruit, un blocking agent a été utilisé.

5. Intérêt du blocking agent (BA) (21)

En absence de cible, l'aptaswitch ne doit théoriquement pas interagir avec la boucle de l'aptakiss. En pratique, il a été montré qu'il existe une interaction aptakiss – aptaswitch (en absence de cible) dépendante de la structure de l'aptaswitch : plusieurs variants d'un aptaswitch pouvant reconnaître l'adénosine, vont interagir différemment avec l'aptakiss, en fonction de leur capacité à adopter une structure secondaire différente (21).

L'introduction d'un troisième oligonucléotide appelé blocking agent (BA) présentant une certaine complémentarité avec les bases de la boucle apicale de l'aptaswitch permet de réduire considérablement cette fixation non spécifique. En effet, en l'absence de cible la fixation de l'aptakiss sur l'aptaswitch est inhibée par le BA. Lorsque la cible est ajoutée, celle-ci induit un changement de conformation de l'aptaswitch ce qui déplace le BA et permet la fixation de l'aptakiss (figure 22).

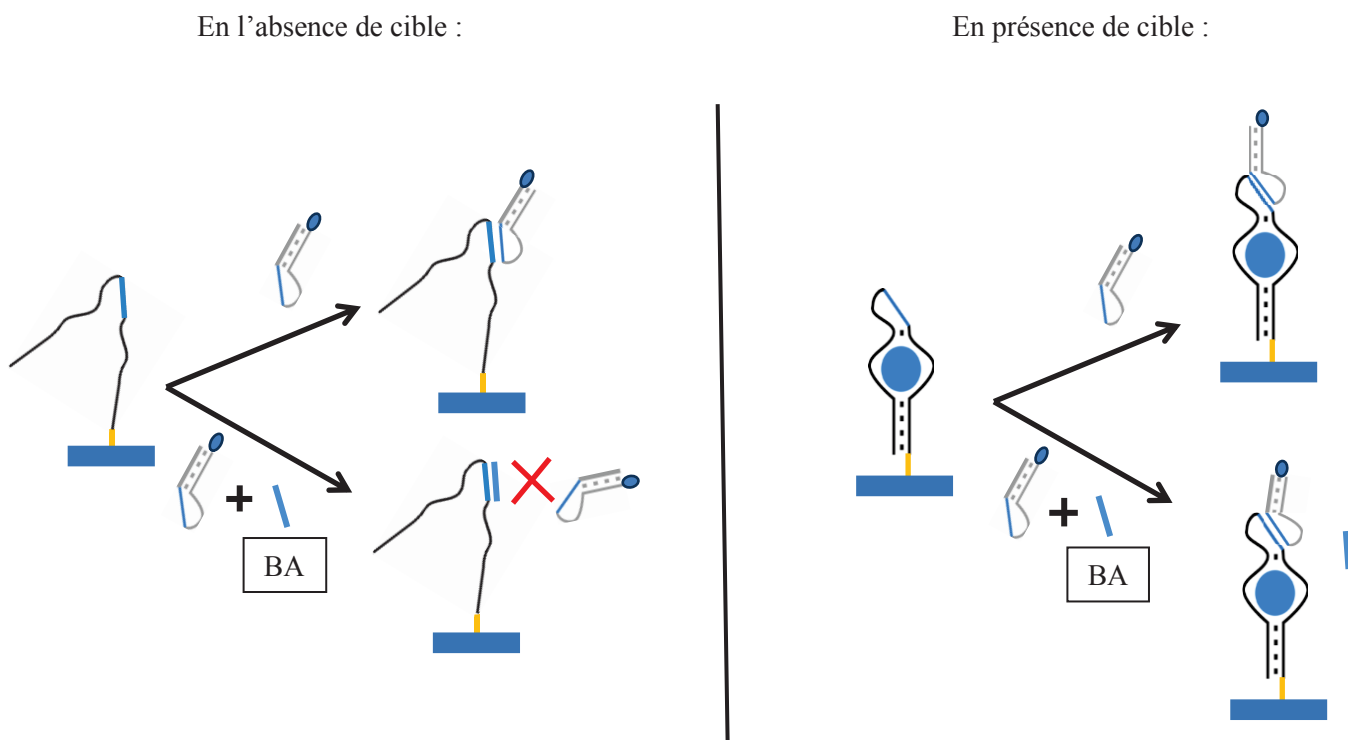


Figure 22 : Rôle du blocking agent

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

1. INTRODUCTION DU SUJET

Les méthodes de dosage basées sur la reconnaissance moléculaire d'une cible avec révélation enzymatique sont très répandues dans des domaines comme la surveillance environnementale, la sécurité alimentaire ou encore la biologie médicale. L'immunoanalyse constitue la part la plus importante de ce secteur, mais présente certaines limites notamment en termes de coût, de variabilité inter-lot et de stabilité thermique.

Les aptamères qui sont des acides nucléiques ayant la faculté de reconnaître spécifiquement une cible ont fait leur apparition depuis quelques années donnant naissance aux méthodes ELAA (enzyme-linked aptamer assay). Les premières techniques ciblaient principalement des protéines (22). Nous avons aujourd'hui de nombreux exemples de dosages de petites molécules (biomarqueurs, contaminants alimentaires...) par ce type de méthode (23). Cependant il s'agit la plupart du temps de techniques à une seule reconnaissance, de type compétitive qui intrinsèquement sont moins sensibles et spécifiques que les méthodes à double reconnaissance moléculaire. Un dosage de type sandwich a été décrit, utilisant un aptamère scindé en deux fragments, capables de s'assembler en présence de la cible (24). Ce type d'approche était d'ailleurs décrit pour les anticorps (25). L'inconvénient de cette stratégie est la perte d'affinité de l'aptamère scindé en deux parties vis-à-vis de la cible (26).

Dans ce travail, nous présentons une nouvelle technique de dosage de petites molécules utilisant une méthode ELAA de type sandwich. Elle implique la formation d'un complexe kissing en présence de cible (méthode ELAKCA pour enzyme-linked aptamer kissing complex assay), entre un aptamère de capture immobilisé dans un puits et un oligonucléotide organisé en épingle à cheveux (20), portant une biotine capable de fixer la peroxydase de raifort (HRP) préalablement greffée à une streptavidine (voir figure 23). L'aptamère de capture (aptaswitch) change de structure au contact de la cible. D'une structure dépliée, il va

former une épingle à cheveux mettant en évidence une boucle apicale. Cette dernière sera substituée par une courte séquence d'ARN capable d'interagir avec la boucle du deuxième oligonucléotide organisé en épingle à cheveux (aptakiss).

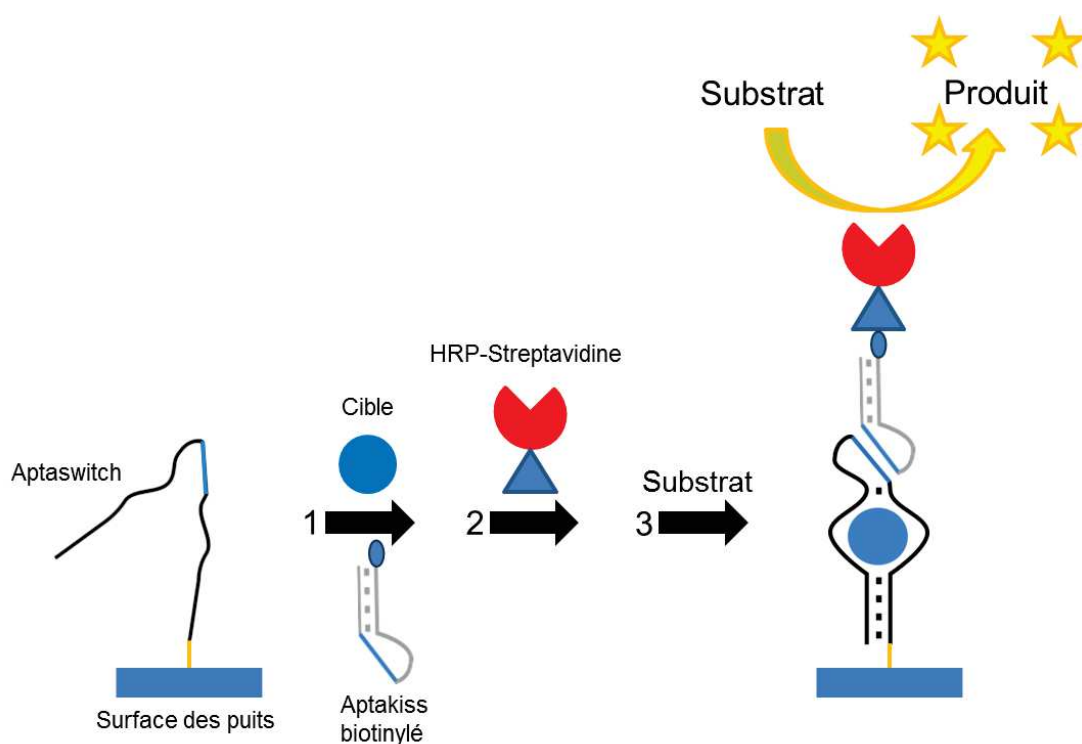


Figure 23 : Illustration d'une technique ELAKCA. La peroxydase de raifort (HRP) permet une détection colorimétrique du système.

Dans un premier temps nous avons voulu tester l'efficacité du greffage de l'aptaswitch et l'efficacité de la révélation enzymatique du système. Pour cela nous avons utilisé deux brins complémentaires, le premier amino-modifié, le second biotinylé. Cette phase validée, nous sommes passés au système final. Le modèle utilisé a été développé précédemment pour le dosage de l'adénosine (20) et a été optimisé (21) par l'ajout d'un blocking agent (figure 24).

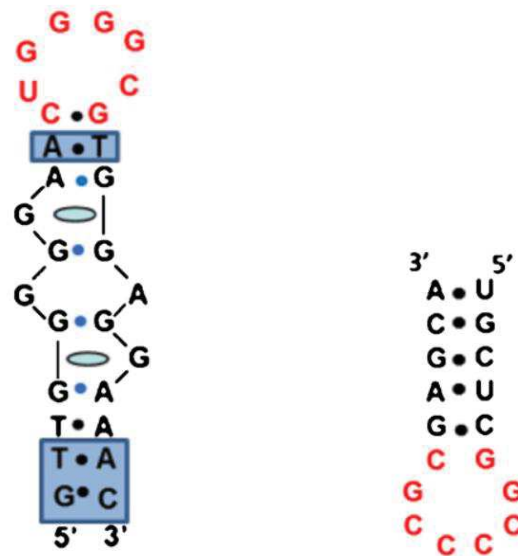


Figure 24 : Aptaswitch anti-adénosine (à gauche) et Aptakiss (à droite) (21). Le premier sera amino-modifié en position 5' et le second sera biotinylé en position 3'.

Nous avons réalisé des tests de spécificité, de conservation des puits après fixation de l'aptaswitch au fond du puits et de réutilisation des puits après une première expérience. Enfin nous avons dosé l'adénosine en milieu complexe (plasma).

2. MATERIEL ET METHODES

Réactifs / matériel

- La β -D-adénosine, l'albumine de sérum bovin (BSA), protectRNA[®] (27) et le tween 20 proviennent de Sigma Aldrich, Saint-Quentin, France.
- NaCl provient de Chimie-Plus laboratoires, Bruyères de Pouilly, France.
- MgCl₂ et EDTA proviennent de Carlsroth, Lauterbourg, France.
- Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, H₂SO₄, la peroxydase de raifort conjuguée à la streptavidine (SA-HRP) et l'Ultra TMB sont fournis par Fisher scientifique, Illkirch, France.
- L'eau utilisée est purifiée par osmose inverse (Merck millipore, Billerica, Massachusetts, États-Unis).
- Les oligonucléotides (table 1) utilisés sont synthétisés et purifiés par HPLC par Eurogentec, Angers, France. L'aptaswitch est l'ADOsw-28 (21) amino modifié (fonction amine terminale séparée de la séquence par un linker C12). L'Aptakiss est le KC24 (20) qui a été biotinylé. Le blocking agent est le BA5 (21).
- Les puits DNA-BIND 1 x 8 stripwell plate amine binding, avec une surface N-Oxysuccinimide, permettant d'immobiliser les oligonucléotides pourvus d'une fonction amine ont été achetés chez Corning, USA.
- Nanosep 3K Omega provient de PALL, USA.
- Plasma humain d'un volontaire sain : prélèvement de sang veineux sur tube hépariné puis centrifugation à 2500 g pendant 15 min.
- Echotherm Orbital mixing pour l'agitation mécanique lente des puits.

- Les lectures d'absorbance sont réalisées sur un spectrophotomètre UV-visible Shimadzu UV mini-1240.

Système brins complémentaires	
Brin amino-modifié	5' NH ₂ -C ₁₂ GATATGCAGAGCATATAAAATGAGGTAGGA 3'
Brin biotinylé	3' CGTCTCGTATATTTTACTCCATCCTCTATA-biotine 5'
Système adénosine	
Aptaswitch amino-modifié	5' NH ₂ -C ₁₂ GTTGGGGGAA(<u>CUGGGGCG</u>)TGGAGGAAAC 3'
Aptakiss	5 (<u>UGCUCGGCCCCGCGAGCA</u>)-biotine 3'
BA	3' GACCCCCTCA 5'

Table 1: Séquences des oligonucléotides utilisés dans l'étude. Les bases d'ARN sont en gras et entre les crochets. Les bases intervenant dans l'interaction entre les deux boucles sont soulignées.

Protocole

Les oligonucléotides sont préparés dans l'eau pure à la concentration de 10^{-4} M ou 10^{-5} M et stockés à -20°C. L'aptaswitch, l'aptakiss et le BA utilisés seront obtenus par dilution dans le tampon approprié.

L'aptaswitch est dilué dans le tampon de fixation (500 mM NaH₂PO₄ - Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, pH=8,5) (28), puis 100 µL sont ajoutés dans chaque puits DNA-BIND (50 pmol / puits). Au cours de la phase d'incubation (1h à température ambiante, agitation mécanique lente), il y a formation de liaisons covalentes entre les résidus N-Oxysuccinimide (NOS) et la fonction amine terminale de l'aptaswitch, via une liaison amide (figure 25).

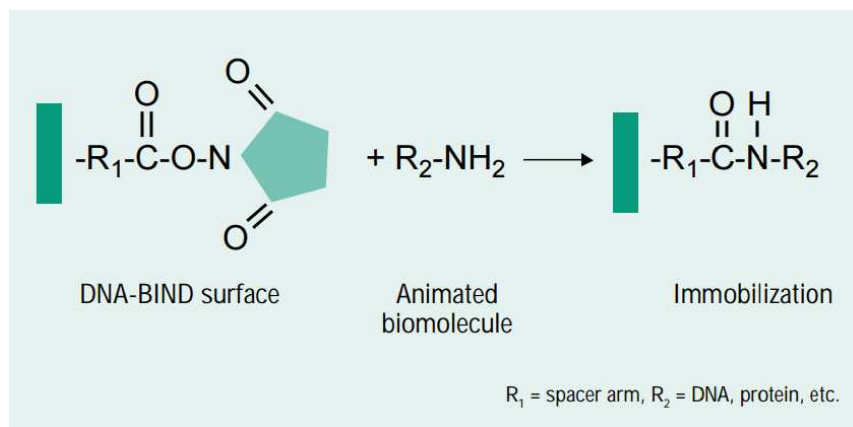


Figure 25 : Fonctionnalisation de la surface des puits (Corning) (28)

Les puits sont lavés trois fois par 200 µL de tampon de lavage (10 mM NaH₂PO₄ - Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,05 % Tween 20, pH=7,5) (29) (24). Les résidus NOS restant sont bloqués par une heure d'incubation à 37°C avec 200 µL de tampon de fixation contenant 5% de BSA et de nouveau lavés trois fois avec le tampon de lavage.

L'aptakiss, le blocking agent et l'adénosine sont préparés ensemble dans le tampon kissing (10 mM NaH₂PO₄ - Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH=7,5) à différentes concentrations. 100 µL sont ensuite ajoutés par puits et incubés 25 minutes à 4°C.

A l'issue de ces 25 minutes, les puits sont vidés, et 100 µL par puits de SA-HRP à la concentration de 7000 pg / puits sont ajoutés. Cette concentration permet d'être en condition saturante d'enzyme (MM (SA – HRP) ≈ 100 000 g / mol). Après 5 minutes de fixation à 4°C, les puits sont lavés trois fois avec 200 µL de tampon kissing. Enfin 100 µL de substrat UltraTMB sont ajoutés par puits. La réaction d'oxydation est stoppée au bout de 5 minutes par ajout de 25 µL d'H₂SO₄ 2M. Après ajout de l'acide, les solutions sont transférées dans une microcuve et l'absorbance est mesurée à 450 nm (28).

Contrôle de l'efficacité du greffage et de la révélation du système par SA-HRP :

Protocole identique mais deux brins complémentaires, un avec une fonction amine terminale et l'autre biotinylé sont utilisés.

Stockage : Après la phase d'immobilisation de l'aptaswitch, les puits sont lavés trois fois par 200 µL de tampon de lavage. 300 µL de tampon de stockage (tampon de lavage contenant 0,2 % de protectRNA[®]) sont ajoutés dans chaque puits. Après la phase de stockage à 4°C, les puits sont lavés trois fois par 200 µL de tampon de lavage, puis le protocole normal est repris par le blocage à la BSA.

Réutilisation : Après réalisation d'une courbe de calibration, les puits sont lavés cinq fois avec du tampon d'élimination de complexe kissing contenant de l'EDTA (10 mM NaH₂PO₄ - Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0,05 % Tween 20, EDTA 20 mM, pH=5,1). Au cours de chacun des cinq cycles de lavage, le tampon d'inhibition kissing complex est maintenu 6 minutes à température ambiante dans les puits. Afin d'éliminer le surplus d'EDTA, les puits sont lavés trois fois par 200 µL de tampon de lavage, et le protocole normal est repris par le blocage à la BSA.

Milieu complexe (plasma) : Les différentes concentrations d'adénosine sont obtenues par dilution en cascade dans le plasma qui est ensuite filtré trois fois sur Nanosep 3K Omega afin d'éliminer les RNases et DNases (30). L'adénosine, dont la masse moléculaire est de 267,24 g/mol, n'est pas retenue par le Nanosep 3K (retient les molécules > 3 kDa). La filtration permet également d'éliminer les autres protéines sériques qui pourraient interagir de manière non spécifique avec les oligonucléotides (31). Le reste du protocole est identique. Protocole de filtration : 1^{ère} filtration : 1h, 12000g ; 2^{ème} filtration : 25min, 11000g ; 3^{ème} filtration : 15min, 9000g.

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Utilisation des brins complémentaires

Avant d'utiliser le système aptaswitch / aptakiss, nous avons utilisé un système plus simple constitué de deux oligonucléotides complémentaires par 25 bases afin de tester l'efficacité du greffage des puits et l'étape de révélation enzymatique du système.

Le premier oligonucléotide est porteur d'une fonction amine terminale qui permettra son immobilisation dans les puits. Le second qui est biotinylé pourra fixer l'HRP-SA.

Deux conditions de greffage ont été utilisées : tampon phosphate 50 mM et tampon phosphate 500 mM. L'efficacité du greffage a été évaluée en réalisant une gamme d'oligonucléotide biotinylé (figure 26).

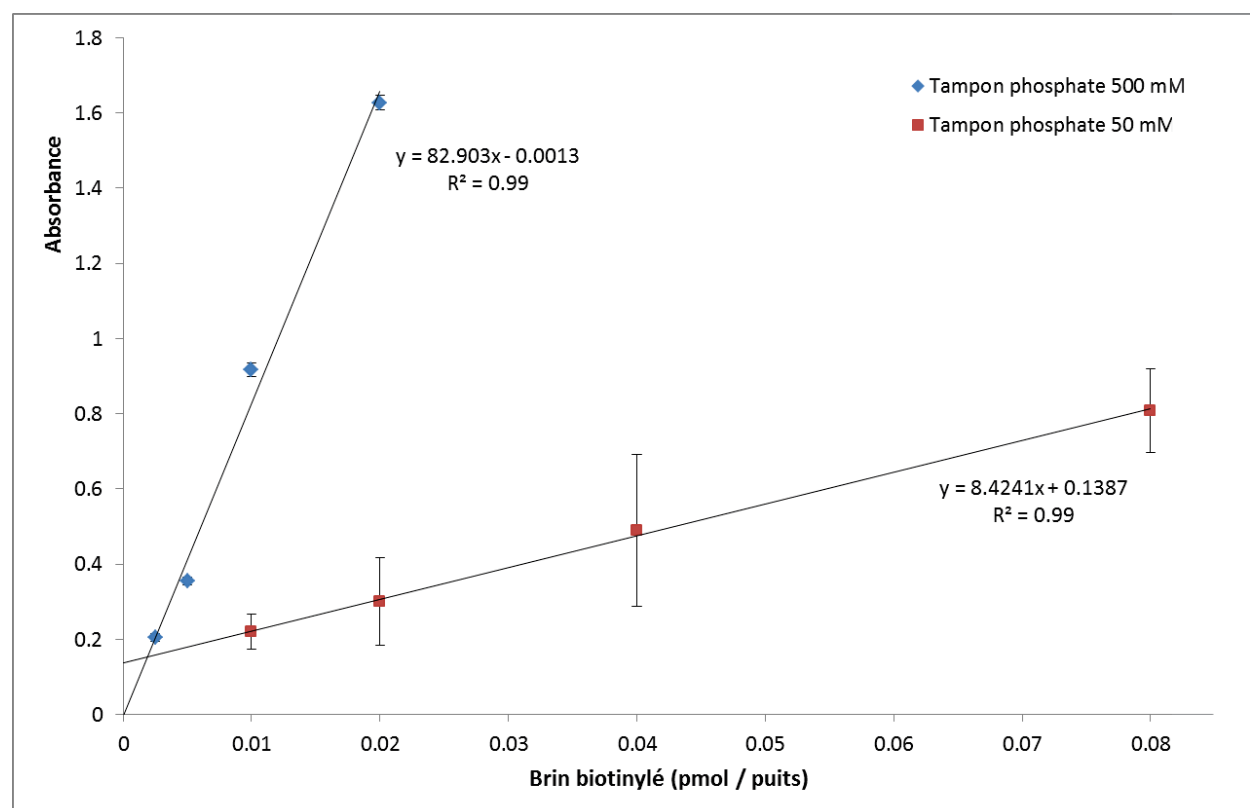


Figure 26 : Gamme d'oligonucléotide biotinylé ; les mesures ont été réalisées en triplicat

Les conditions de greffage sont très dépendantes de la molarité du tampon de fixation : Avec le tampon phosphate 500 mM, la réponse est linéaire et répétable (points obtenus en triplicat). De très petites quantités d'oligonucléotide biotinylé permettent d'obtenir des absorbances importantes (environ 1 d'absorbance pour 0,01 pmol de brin biotinylé) ce qui prouve que nous avons une bonne amplification du signal par l'enzyme. Avec le tampon phosphate 50 mM, les résultats sont non répétables, le signal est faible (0,2 d'absorbance pour 0,01 pmol de brin biotinylé) et le bruit de fond est important (environ 0,15 d'absorbance pour 0 pmol de brin biotinylé).

Les conditions de greffage avec le tampon 500 mM sont satisfaisantes. L'immobilisation du brin porteur de la fonction amine est efficace et répétable entre les puits, ce qui nous a permis de passer au système final : dosage de l'adénosine impliquant la formation d'un complexe boucle – boucle entre l'aptaswitch et l'aptakiss (voir figure 23).

Système final aptaswitch – aptakiss

Afin de diminuer le signal lié à la fixation non spécifique de l'aptaswitch sur l'aptakiss en l'absence de cible, un BA (21) a été utilisé.

Dans le but de choisir la concentration optimale d'aptakiss, et après immobilisation de l'aptaswitch amino-modifié, quatre gammes d'aptakiss biotinylé ont été réalisées dans différentes situations (figure 27) :

- Aptakiss seul
- Aptakiss + BA (5 pmol / puits)
- Aptakiss + Adénosine (100 μ M)
- Aptakiss + BA (5 pmol / puits) + Adénosine (100 μ M)

Les concentrations de BA et d'adénosine ont été déterminées lors d'expériences préliminaires non présentées ici :

- 5 pmol de BA par puits permettent de diminuer considérablement le signal non spécifique (fixation de l'aptakiss sur l'aptaswitch en absence de cible) tout en laissant la possibilité à l'adénosine de venir déplacer le BA.
- 100 μ M d'adénosine permettent d'être dans la zone de saturation du système.

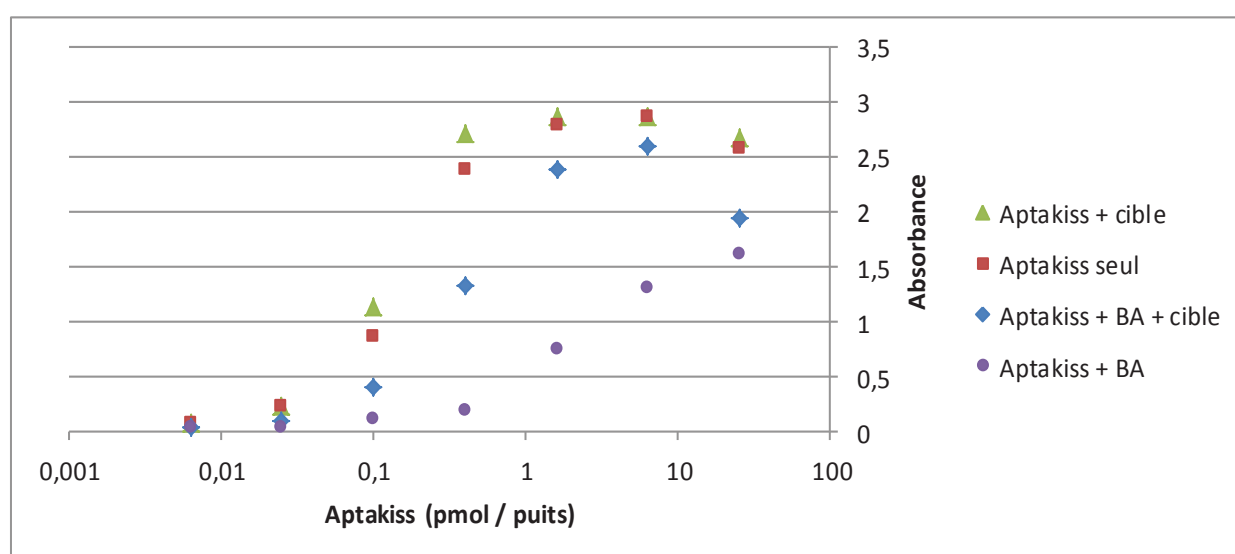


Figure 27 : Variation de l'aptakiss dans différentes situations

Les différences et les ratios entre les valeurs d'absorbance en présence et en absence de cible (points bleus et violets) nous ont permis de sélectionner la quantité d'aptakiss pour la suite des expériences. La quantité de 0,4 pmol par puits a été retenue : le signal non spécifique (point violet) est très faible alors que le signal spécifique (différence entre le point bleu et le point violet) est proche du maximal. Une courbe de calibration de l'adénosine a ensuite été réalisée.

Courbe de calibration de l'adénosine

Les paramètres suivants ont été fixés :

- Aptakiss = 0,4 pmol / puits
- Blocking agent = 5 pmol / puits

Nous avons fait varier l'adénosine entre 3,9 et 1000 μM (figure 28). Chaque point étant réalisé en triple (triplicat). Le rapport S/B est obtenu de la manière suivante :

$$S/B = \frac{A_{\text{mesurés}} - A_{\text{blanc}}}{A_0 - A_{\text{blanc}}}$$

A_0 correspond à l'absorbance du puits contenant : aptakiss + BA + 0 μM d'adénosine.

A_{blanc} correspond à l'absorbance du puits contenant : tampon kissing (absence d'aptakiss et de BA).

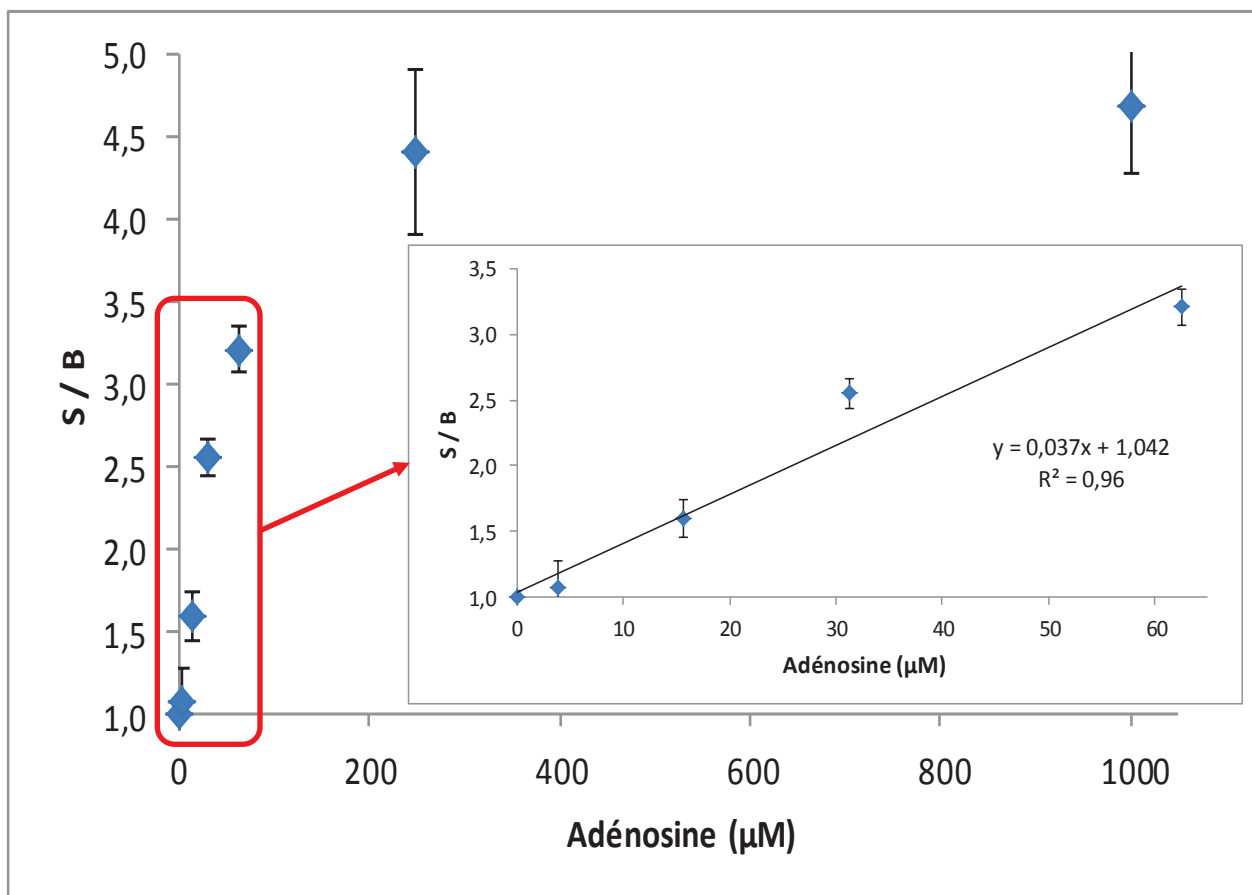


Figure 28 : Courbe de calibration de l'adénosine

Les données sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Adénosine (µM)	Absorbance moyenne	S/B	Ecart-type	CV
Blanc	0,04		0,091	68,2
0	0,37	1	0,053	4,7
3,9	0,40	1,07	0,20	17,0
15,6	0,57	1,60	0,15	8,6
31,25	0,89	2,55	0,11	4,1
62,5	1,10	3,21	0,14	4,1
250	1,50	4,41	0,50	11,0
1000	1,59	4,70	0,41	8,5

Limite de linéarité

Le coefficient de corrélation linéaire ($r = 0,98$) proche de 1 indique l'existence d'une relation linéaire forte entre la concentration d'adénosine et le rapport S/B. Sur le domaine de linéarité $[0 \mu\text{M} ; 62,5 \mu\text{M}]$, le point à $31,25 \mu\text{M}$ d'adénosine est celui s'écartant le plus de la droite : on observe un écart d'environ 15 % par rapport à notre modèle. Cet écart est jugé acceptable étant donné que les mesures sont faites en triplicat. Dans ces conditions la limite de linéarité est de $62,5 \mu\text{M}$ d'adénosine.

Limite de détection

La limite de détection a été estimée à l'aide de la formule suivante (norme ICH) :

$$LD = 3,3 \sigma / S$$

Où σ est l'écart-type de la réponse

S est la pente de la droite de calibration

L'écart-type de la réponse a été estimé à l'aide de l'écart-type du point à $0 \mu\text{M}$ d'adénosine : $\sigma_0 = 0,053$

La pente de la droite de calibration a été estimée à : $S = 0,037$

Dans ces conditions, nous obtenons $LD = 4,7 \mu M$.

Cette valeur est une estimation car l'écart-type de la réponse a été estimé sur trois valeurs de blanc ($0 \mu M$ d'adénosine).

Spécificité

Une étude de la spécificité de l'aptaswitch vis-à-vis de l'adénosine a été réalisée avec plusieurs purines à la concentration de $250 \mu M$ (figure 30) :

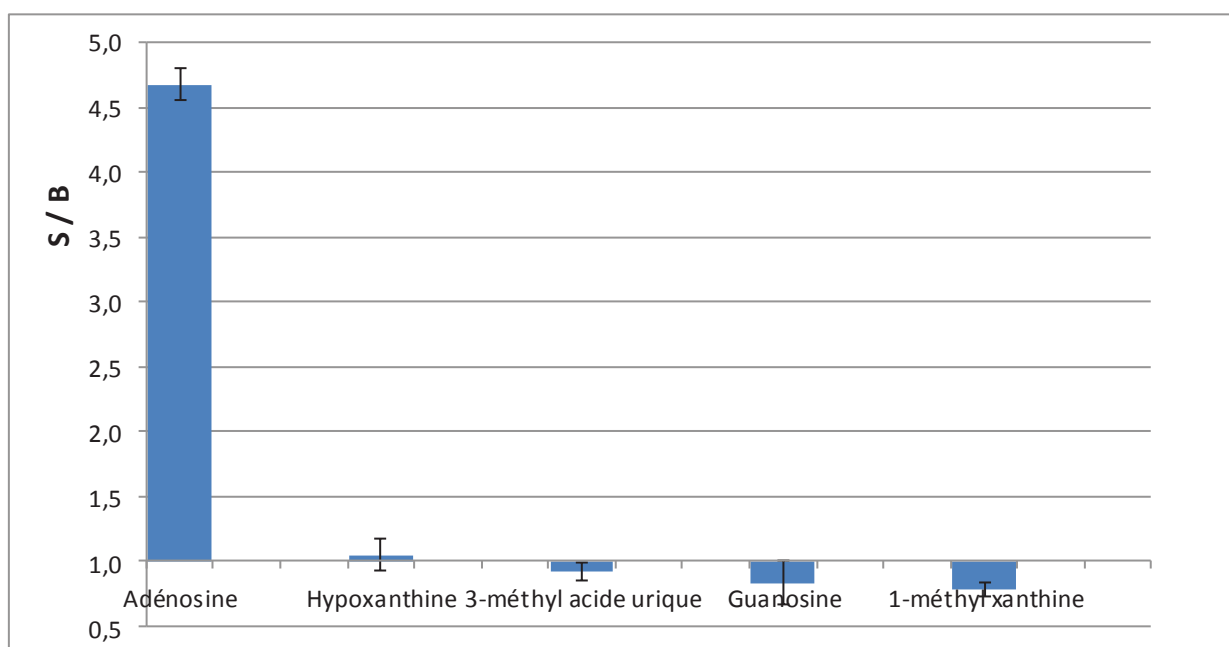


Figure 30 : Etude de la spécificité

Les molécules étudiées présentent de fortes homologies structurales avec l'adénosine comme en témoigne la figure 31.

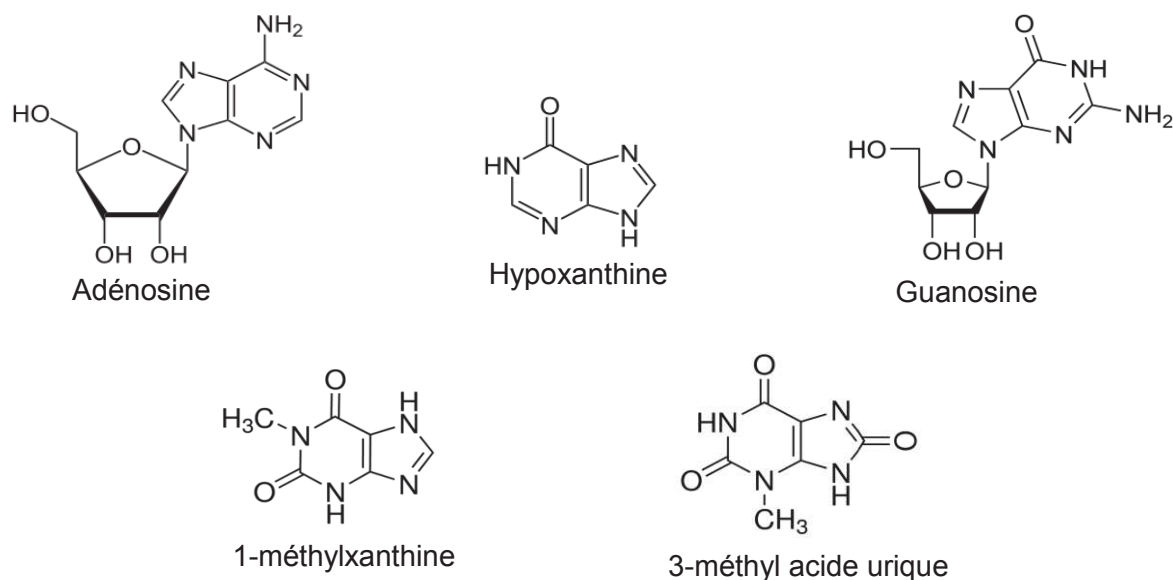


Figure 31 : Purines étudiées lors de l'étude de la spécificité

La concentration de 250 μM a été choisie de façon à être largement au dessus de la limite de linéarité du système, afin d'amplifier une éventuelle réactivité croisée. L'adénosine à la concentration de 250 μM présente un rapport S/B d'environ 4,5. Les purines testées présentent elles un rapport S/B proche de 1, ce qui indique qu'elles ne sont pas reconnues par le système aptaswitch / aptakiss. Les pourcentages de réactivité croisée sont proches de 0 % pour les quatre molécules étudiées

Stockage des plaques avec l'aptaswitch immobilisé

L'aptaswitch a été fixé dans trois séries de puits. La première série a servi à réaliser notre calibration à J0, les deux suivantes ont été stockées dans du tampon contenant du protectRNA[®] (figure 32) et ont permis les dosages à J2 et à J14.

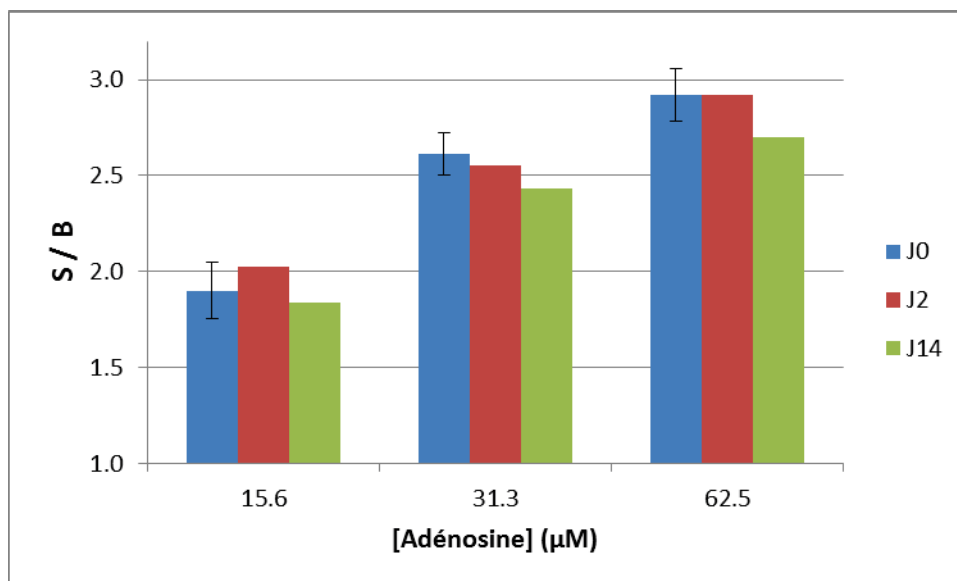


Figure 32 : Stabilité temporelle des puits avec aptaswitch immobilisé

Les points à J0, J2 et J14 ont été obtenus avec un seul dosage. Les écarts-types utilisés pour les points à J0 sont ceux issus de la courbe de calibration de l'adénosine (triplicat).

Les points à J2 et J14 sont compris dans l'intervalle $[\mu_{J0}^* - 2\sigma ; \mu_{J0} + 2\sigma]$. Il n'y a donc pas de changement significatif de rapport S/B sur deux semaines. L'inhibiteur de RNases (protectRNA[®]) permet d'inhiber la dégradation des oligonucléotides par les RNases présentes dans l'environnement. Le stockage du système est possible sur une période de deux semaines.

* μ = moyenne

Réutilisation des puits après une première calibration

La courbe de calibration de l'adénosine a été réalisée trois fois de suite sur les mêmes puits. Des phases de lavage entre chaque calibration ont été nécessaires pour éliminer les complexes kissing formés. Nous avons testé différentes conditions en faisant varier trois paramètres : la concentration d'EDTA, la température et le nombre de cycles de lavage.

L'EDTA est un chélateur de cations et en particulier du magnésium. Il va donc inhiber la reconnaissance cible – aptaswitch et la formation du complexe kissing, dépendante du magnésium. La chaleur va, quant à elle, défavoriser la formation des complexes kissing. Cependant, les lavages à température supérieure à la température ambiante ont entraîné d'importantes diminutions du signal, vraisemblablement dues à une dégradation de l'aptaswitch immobilisé.

Pour vérifier que nos conditions de lavage permettent l'élimination de l'ensemble du complexe Enzyme – Aptakiss – Cible, nous avons fait des tests complémentaires :

- 1) Première calibration suivie du lavage des puits avec les conditions retenues. Le substrat (TMB) est ensuite directement ajouté, ce qui permet de contrôler l'absence d'enzyme, le signal mesuré étant proche de 0.
- 2) Première calibration suivie du lavage des puits avec les conditions retenues. L'enzyme est ensuite ajoutée, suivie du TMB. Le signal proche de 0 indique que l'aptakiss a bien été éliminé.

Les conditions de lavage retenues sont 5 cycles d'élimination de 6 minutes à température ambiante avec un tampon d'élimination de complexe kissing contenant 20 mM d'EDTA.

Les trois courbes de calibration successives ont été réalisées avec élimination des complexes kissing formés, entre chaque calibration. Sur la figure 33, les écarts-types des points références bleus (première courbe de calibration) correspondent à ceux issus de la courbe de calibration de l'adénosine en triplicat. Dans ces conditions, une légère baisse de signal est observée mais les rapports S/B des points de la première et de la deuxième réutilisation sont compris dans l'intervalle $[\mu_{\text{Ref}} - \sigma ; \mu_{\text{Ref}} + \sigma]$, ce qui indique qu'on n'observe pas de différence significative avec les points références. Cela démontre que les puits peuvent être utilisés trois fois de suite.

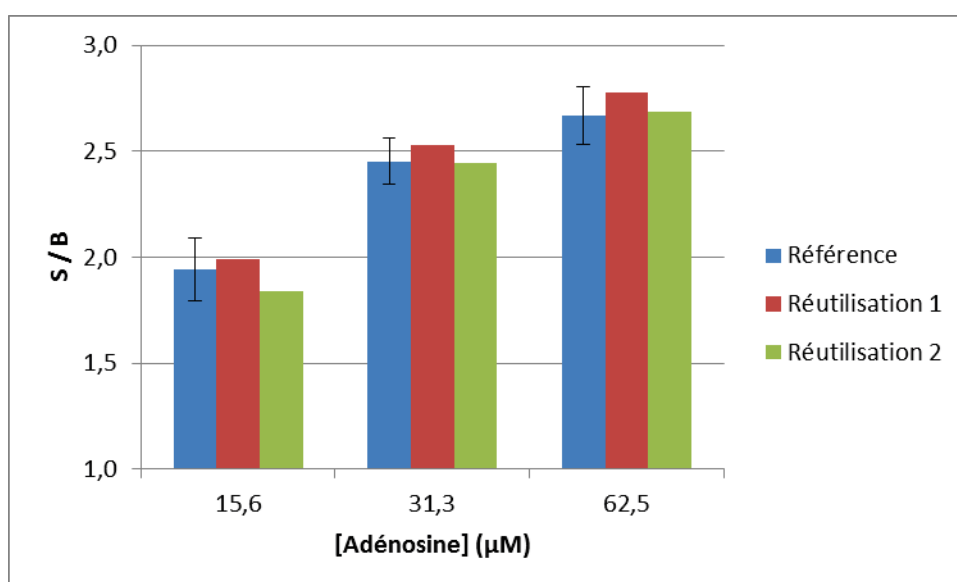


Figure 33 : Réutilisation des puits

Dosage en milieu complexe (plasma)

L'aptaswitch est un oligonucléotide chimérique constitué de ribonucléotides et de désoxyribonucléotides. L'aptakiss est lui un oligonucléotide tout ARN. Les oligonucléotides sont extrêmement sensibles aux RNases et DNases présentes dans le plasma humain. Nous avons utilisé des Nanosep 3K Omega pour filtrer le plasma dans le but d'éliminer ces

enzymes. Cette filtration est indispensable : sans pré-traitement du plasma, l'absorbance pour l'ensemble de la gamme est voisine de zéro. Les recouvrements (figure 34) ont été calculés pour chaque concentration de la manière suivante :

$$\text{Recouvrement (\%)} = \frac{S/B_{\text{plasma}}}{S/B_{\text{tampon}}} \times 100$$

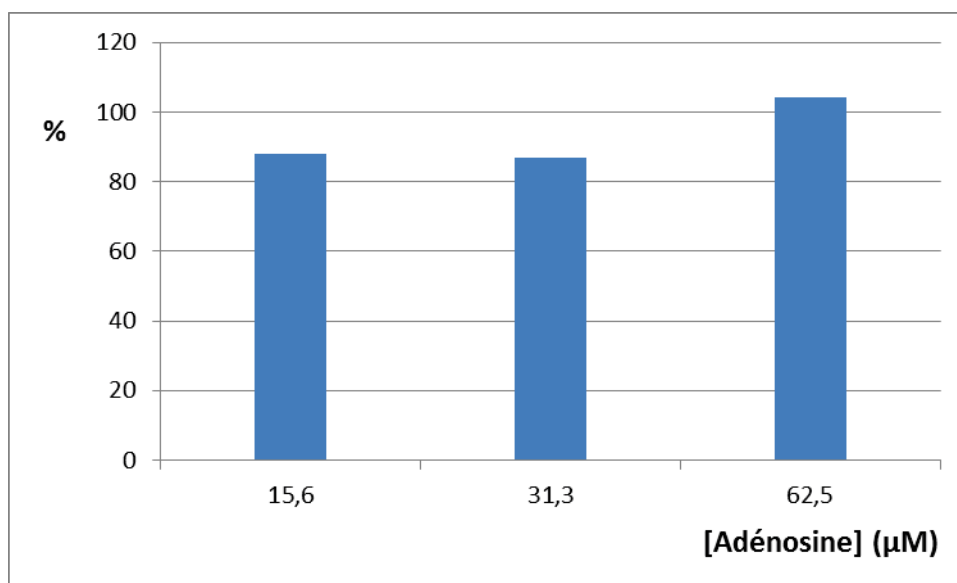


Figure 34 : Recouvrement (plasma versus tampon)

Le pré-traitement est une étape longue, mais pouvant être réalisée pendant l'étape de greffage et de blocage des puits, ce qui n'allonge pas la durée de l'essai. Les recouvrements proches de 100% indiquent que l'élimination des RNases et DNases a été efficace.

L'utilisation d'oligonucléotides modifiés, résistants à la dégradation des nucléases serait un moyen de s'affranchir de l'étape de pré-traitement.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

THESE SOUTENUE PAR : BENOIT CHOVELON

L'immunoanalyse à une seule reconnaissance pour le dosage des petites molécules, présente intrinsèquement des limites en termes de sensibilité et de spécificité. L'utilisation d'un second anticorps pour augmenter les performances analytiques est une très bonne alternative pour les protéines. Par contre pour des raisons d'accessibilité, l'utilisation d'une double reconnaissance par anticorps n'est actuellement pas possible pour le dosage des petites molécules. Les aptamères, par leur simplicité de synthèse et leur possibilité d'interaction avec des cibles extrêmement variées, semblent pouvoir offrir une alternative très intéressante aux anticorps pour ce type de dosage.

Nous avons développé ici, pour la première fois une nouvelle technique de dosage à double reconnaissance, en phase hétérogène, basée sur l'induction par la cible d'un complexe kissing (méthode ELAKCA) entre un aptamère de structure tige-boucle modifié (aptaswitch) immobilisé sur la phase solide et un oligonucléotide biotinylé (aptakiss). La détection est réalisée via l'utilisation de l'enzyme HRP (couplée à la streptavidine). Le dosage a été mis au point sur l'adénosine (petite molécule modèle). Cette technique a montré une grande spécificité et une grande stabilité de l'aptaswitch immobilisé, comme en témoignent les études de stockage et de réutilisation des puits greffés. Son principal inconvénient, comme pour toutes techniques en phase hétérogène est sa durée importante due aux nombreuses étapes d'incubation et de lavage. Afin de s'affranchir de l'utilisation du blocking agent, introduit pour limiter la fixation non spécifique de l'aptakiss et ainsi améliorer la répétabilité du système, une nouvelle boucle kissing actuellement étudiée au laboratoire pourrait être utilisée.

Nous avons montré que l'application de la méthode ELAKCA sur une matrice biologique est possible si un pré-traitement de l'échantillon est réalisé dans le but d'éliminer les RNases et DNases. Afin de s'affranchir de cette étape, des oligonucléotides modifiés, stables en présence de ces nucléases pourraient être utilisés (27).

De nombreux aptamères s'organisent en épingle à cheveux en présence de leur cible, ce qui permet d'envisager la transposition de ce système à de nombreuses petites molécules dont le dosage est difficile. La méthode va notamment être adaptée au dosage de la théophylline à l'aide d'un aptamère anti-théophylline tout ARN puis sera comparée à celle utilisée sur les automates Vista (SIEMENS) au sein du Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie (DBTP) du CHU de Grenoble.

LE DOYEN



LE PRESIDENT DE LA THESE

Pr Patrice Faure
Département de Biochimie,
Toxicologie et Pharmacologie
Responsable Pr Patrice FAURE
Pôle de Biologie - CHU de Grenoble
CS 10217 - 38043 GRENOBLE CEDEX 9
Tel. 04 76 76 54 84 - Tel. 04 76 76 56 64

RESUME

Les immunodosages sont omniprésents dans les laboratoires de biologie médicale, en particulier en biochimie où ils permettent le dosage de très nombreuses protéines. Un état des lieux des méthodes d'immunoanalyse utilisées au sein du Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie (DBTP) du CHU de Grenoble a été établi. Le dosage des molécules de petite taille n'utilise qu'un seul anticorps comme outil de reconnaissance moléculaire, ce qui pourra générer des défauts de sensibilité et de spécificité. La recherche de nouvelles méthodes de dosage dédiées aux petites molécules, spécifiques, robustes, peu coûteuses sont donc nécessaires pour s'affranchir des limites de l'immunoanalyse. .

Les aptamères sont des oligonucléotides sélectionnés par méthode SELEX pour se lier spécifiquement et avec une forte affinité à une cible. De par leur simplicité de synthèse et leur possibilité de reconnaître des cibles extrêmement variées, ils offrent une alternative très intéressante aux anticorps.

Nous rapportons ici une nouvelle technique en phase hétérogène, basée sur l'induction par la cible d'un complexe kissing entre deux oligonucléotides (ELAKCA). Nous avons travaillé avec un aptamère modifié (aptaswitch) changeant de conformation au contact de sa cible. Une fois immobilisé dans les puits via une liaison amide, l'aptaswitch forme une épingle à cheveux en présence de la cible. Sa boucle apicale va être reconnue par la boucle d'un second oligonucléotide (aptakiss) organisé également en épingle à cheveux, pour former un complexe kissing. L'aptakiss étant biotinylé, il pourra fixer la peroxydase de raifort couplée à la streptavidine (SA – HRP). L'ajout d'un substrat chromogène (UltraTMB) permettra de générer un signal proportionnel à la concentration de cible. Le système a été appliqué au dosage de l'adénosine, la spécificité ainsi que les conditions de stockage et de réutilisation ont

été étudiées. Enfin une courbe de calibration de l'adénosine a été réalisée en milieu complexe (plasma).

Mots clés : Aptamère, complexe kissing, complexe boucle-boucle, petites molécules, adénosine, immunodosage, ELAKCA



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

ANNEXE 1 (Immunoanalyse sans marqueur)

Paramètre	Automate
BIOCHIMIE	
Alpha1-antitrypsine (A1AT)	BN ProSpec
Alpha2-macroglobuline (A2MAC)	BN ProSpec
Céuloplasmine (CER)	BN ProSpec
CRP ultrasensible	BN ProSpec
Retinol Binding Protein (RBP)	BN ProSpec
Alpha1-glycoprotéine acide (A1AG) (orosomucoïde)	Vista
Albumine (sérum ou urine) (MALB ou SALB)	Vista
Apolipoprotéine A1	Vista
Apolipoprotéine B	Vista
Béta2-microglobuline (B2MIC)	Vista
CRP	Vista
Fibronectine	Vista
Haptoglobuline	Vista
Préalbumine (PREALB)	Vista
Récepteur soluble de la transferrine (STFR)	Vista
Transferrine	Vista
PHARMACO-TOXICOLOGIE	
Carbamazépine (CRBM)	Vista Inhibition de turbidimétrie (PETINIA)
Gentamicine (GENT)	Vista Inhibition de turbidimétrie (PETINIA)
Phénobarbital (PHNO)	Vista Inhibition de turbidimétrie (PETINIA)
Phénytoïne (PTN)	Vista Inhibition de turbidimétrie (PETINIA)
Théophylline (THEO)	Vista Inhibition de turbidimétrie (PETINIA)
Tobramycine (TOBR)	Vista Inhibition de turbidimétrie (PETINIA)
Acide Valproïque (VALP)	Vista Inhibition de turbidimétrie (PETINIA)
Vancomycine (VANC)	Vista Inhibition de turbidimétrie (PETINIA)

ANNEXE 2 (Immunoanalyse avec marqueur)

Paramètre	Automate	Compétition (1 site) / Sandwich (2 sites)	Méthode
BIOCHIMIE			
Estradiol (E2)	Vista	Compétition	Chimiluminescence (LOCI compétition)
Hormones thyroïdiennes (T4L et T3L)	Vista	Compétition	Chimiluminescence (LOCI compétition)
Progestérone (PROG)	Vista	Compétition	Chimiluminescence (LOCI compétition)
Antigène prostatique spécifique total et libre	Vista	Sandwich	Chimiluminescence (LOCI)
CA 15-3	Vista	Sandwich	Chimiluminescence (LOCI)
CA 19-9	Vista	Sandwich	Chimiluminescence (LOCI)
Ferritine	Vista	Sandwich	Chimiluminescence (LOCI)
Hormone Chorionique Gonadotrope (HCG)	Vista	Sandwich	Chimiluminescence (LOCI)
LH	Vista	Sandwich	Chimiluminescence (LOCI)
Myoglobine (MYO)	Vista	Sandwich	Chimiluminescence (LOCI)
NT-proBNP (PBNP)	Vista	Sandwich	Chimiluminescence (LOCI)
Thyréostimuline (TSH)	Vista	Sandwich	Chimiluminescence (LOCI)
Troponine	Vista	Sandwich	Chimiluminescence (LOCI)
Procalcitonine	Kryptor	Sandwich	Fluorescence TRACE
Alpha fœto-protéine (AFP)	Centaur	Sandwich	Chimiluminescence
Cortisol	Centaur	Compétition	Chimiluminescence
Hormone parathyroïdienne (PTH)	Centaur	Sandwich	Chimiluminescence
Vitamine B9 (Folate)	Centaur	Compétition	Chimiluminescence
Vitamine B12 (Cobalamine)	Centaur	Compétition	Chimiluminescence

PHARMACO-TOXICOLOGIE			
Acide salicylique (XSALI)	Vista	Compétition	EMIT
Amikacine (XAMIK)	Vista	Compétition	EMIT
Amphétamine (AMPH)	Vista	Compétition	EMIT
Antidépresseurs tricycliques (XADT)	Vista (réactif ThermoScientific)	Compétition	EMIT
Benzodiazépine (BENZ)	Vista	Compétition	EMIT
Cocaïne (COC)	Vista	Compétition	EMIT
Exstasy = MDMA (EXTC)	Vista	Compétition	EMIT
Méthadone (METH)	Vista	Compétition	EMIT
Opiacés (OPI)	Vista	Compétition	EMIT
THC (THC)	Vista	Compétition	EMIT
Digoxine (DIGXN)	Vista	Compétition	LOCI compétition

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Toh SY, Citartan M, Gopinath SCB, Tang T-H. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosens Bioelectron.* 2015;64:392-403.
2. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 1990;346(6287):818-22.
3. Toulmé J, Giegé R. Les aptamères : des ligands et des catalyseurs oligonucléotidiques obtenus par sélection in vitro. *médecine/sciences.* 1998;14(2):155.
4. Massart C, Alcaraz-Galvain D, Bordenave L, Boux de Casson F, Charrié A, Chikh K, et al. Immunoanalyse : De la théorie aux critères de choix en biologie clinique. Bonchamp-lès-Laval: EDP Sciences; 2009. 261 p.
5. Durand G, Beaudeau J-L. Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives. Lavoisier; 2011. 643 p.
6. Chatenoud, Bach. Immunologie - 6e édition. Lavoisier; 2012. 490 p.
7. Colineaux F, Fougerolle G, Lepage J-M. Espace pédagogique : sciences de la vie et de la terre - Ouchterlony [Internet]. [cité 13 août 2015]. Disponible sur: <http://www.pedagogie.ac-nantes.fr/sciences-de-la-vie-et-de-la-terre/enseignement/ressources-pedagogiques/ouchterlony-681573.kjsp?RH=1351104629218>
8. Irvine D, Tuerk C, Gold L. SELEXION. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment with integrated optimization by non-linear analysis. *J Mol Biol.* 1991;222(3):739-61.
9. Université Provence Agora. Les acides nucléiques. [Internet]. [cité 10 août 2015]. Disponible sur: http://sites.univ-provence.fr/wabim/d_agora/d_biochimie/nucleiques.pdf
10. Dardel F, Képès F. Bioinformatique: génomique et post-génomique. Editions Ecole Polytechnique; 2002. 254 p.
11. Ruta J. Aptamères énantiosélectifs en série ADN et ARN : applications à la séparation chirale en micro-chromatographie et en électrophorèse capillaire (EC) [Internet]. Grenoble 1; 2008 [cité 14 août 2015]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2008GRE10192>
12. Ma D-L, Pui-Yan V, Leung K-H, Zhong H-J, He H-Z, Shiu-Hin D, et al. Structure-Based Approaches Targeting Oncogene Promoter G-Quadruplexes. In: Siregar Y, éditeur. *Oncogene and Cancer - From Bench to Clinic* [Internet]. InTech; 2013 [cité 10 août 2015]. Disponible sur: <http://www.intechopen.com/books/oncogene-and-cancer->

from-bench-to-clinic/structure-based-approaches-targeting-oncogene-promoter-g-quadruplexes

13. Guthrie JW, Hamula CLA, Zhang H, Le XC. Assays for cytokines using aptamers. *Methods*. 2006;38(4):324-30.
14. Ciesiolka J, Gorski J, Yarus M. Selection of an RNA domain that binds Zn²⁺. *RNA*. 1995;1(5):538-50.
15. Huizenga DE, Szostak JW. A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry*. 1995;34(2):656-65.
16. Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*. 1994;263(5152):1425-9.
17. Purschke WG, Eulberg D, Buchner K, Vonhoff S, Klusmann S. An L-RNA-based aquaretic agent that inhibits vasopressin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(13):5173-8.
18. Schneider DJ, Feigon J, Hostomsky Z, Gold L. High-affinity ssDNA inhibitors of the reverse transcriptase of type 1 human immunodeficiency virus. *Biochemistry*. 1995;34(29):9599-610.
19. Wiegand TW, Williams PB, Dreskin SC, Jouvin MH, Kinet JP, Tasset D. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. *J Immunol*. 1996;157(1):221-30.
20. Durand G, Lisi S, Ravelet C, Dausse E, Peyrin E, Toulmé J-J. Riboswitches Based on Kissing Complexes for the Detection of Small Ligands. *Angew Chem Int Ed*. 2014;53(27):6942-5.
21. Goux E, Lisi S, Ravelet C, Durand G, Fiore E, Dausse E, et al. An improved design of the kissing complex-based aptasensor for the detection of adenosine. *Anal Bioanal Chem*. 2015;407(21):6515-24.
22. Drolet DW, Moon-McDermott L, Romig TS. An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nat Biotechnol*. 1996;14(8):1021-5.
23. Park H, Paeng IR. Development of direct competitive enzyme-linked aptamer assay for determination of dopamine in serum. *Anal Chim Acta*. 2011;685(1):65-73.
24. Sharma AK, Kent AD, Heemstra JM. Enzyme-linked small-molecule detection using split aptamer ligation. *Anal Chem*. 2012;84(14):6104-9.
25. Islam KN, Ihara M, Dong J, Kasagi N, Mori T, Ueda H. Direct construction of an open-sandwich enzyme immunoassay for one-step noncompetitive detection of thyroid hormone T4. *Anal Chem*. 2011;83(3):1008-14.

26. Zuo X, Xiao Y, Plaxco KW. High specificity, electrochemical sandwich assays based on single aptamer sequences and suitable for the direct detection of small-molecule targets in blood and other complex matrices. *J Am Chem Soc.* 2009;131(20):6944-5.
27. Brumby A, Ravelet C, Grosset C, Ravel A, Villet A, Peyrin E. Chiral stationary phase based on a biostable L-RNA aptamer. *Anal Chem.* 2005;77(7):1993-8.
28. Corning®. Surface Technologies - Application note. [Internet]. [cité 14 août 2015]. Disponible sur:
http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/Media/pdf/an_techparameters_dna-bind.pdf
29. Nie J, Deng Y, Deng Q-P, Zhang D-W, Zhou Y-L, Zhang X-X. A self-assembled aptamer fragment/target complex based high-throughput colorimetric aptasensor using enzyme linked aptamer assay. *Talanta.* 2013;106:309-14.
30. Rowe AA, Miller EA, Plaxco KW. Reagentless measurement of aminoglycoside antibiotics in blood serum via an electrochemical, ribonucleic acid aptamer-based biosensor. *Anal Chem.* 2010;82(17):7090-5.
31. Perrier S, Zhu Z, Fiore E, Ravelet C, Guieu V, Peyrin E. Capillary gel electrophoresis-coupled aptamer enzymatic cleavage protection strategy for the simultaneous detection of multiple small analytes. *Anal Chem.* 2014;86(9):4233-40.