



HAL
open science

Les aptamères au service du diagnostic biologique : développement d'un essai avec détection par ICP-MS

Blandine Billet

► **To cite this version:**

Blandine Billet. Les aptamères au service du diagnostic biologique : développement d'un essai avec détection par ICP-MS. Sciences pharmaceutiques. 2023. dumas-04261112

HAL Id: dumas-04261112

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04261112v1>

Submitted on 26 Oct 2023

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.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

Année : 2023

**LES APTAMÈRES AU SERVICE DU DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE :
DÉVELOPPEMENT D'UN ESSAI AVEC DÉTECTION PAR
ICP-MS**

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES EN
INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE
TENANT LIEU DE
THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

SOUTENU PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Le 19/10/2023

Par Mme Blandine BILLET

[Données à caractère personnel]

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président du jury :

M. le Pr Patrice FAURE

Membres :

M. le Pr Eric PEYRIN (directeur de thèse)

Mme le Pr Corinne RAVELET (co-directrice de thèse)

M. le Dr Benoit CHOVELON

Mme le Dr Christelle MACHON

L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

ENSEIGNANTS - CHERCHEURS Année 2023 / 2024

Doyen de la Faculté - Pr Michel SÈVE
 Vice-Doyen Pédagogie - Dr Pierre CAVAILLÈS
 Vice-Doyen Recherche – Pr Walid RACHIDI

STATUT	NOM	PRÉNOM	LABORATOIRE	HDR
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx	Oui
PU-PH	ALLENET	BENOÎT	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, ThEMAS	Oui
AHU	AMEN	AXELLE		
Professeur Emérite	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	
MCF	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, ThEMAS	
MCF	BATANDIER	CÉCILE	GIN-U1216 INSERM	
PU-PH	BEDOUCHE	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, ThEMAS	Oui
MAST	BELLET	BÉATRICE	-	
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR 5063 CNRS	
PU	BOUMENDJEL	AHCÈNE	LRB -INSERM U 1039	Oui
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR E3 CEA	Oui
MCF	BRIANÇON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042	Oui
PU	BURMEISTER	WILHEM	UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS	Oui
PU-PH	BUSSER	BENOÎT	IAB-UMR 5309 CNRS- INSERM U1209	Oui
Professeur Emérite	CALOP	JEAN		
MCF	CAVAILLÈS	PIERRE	IAB-UMR 5309 CNRS- INSERM U1209	
MCU-PH	CHANOINE	SÉBASTIEN	CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309	
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
MCU-PH	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR 5063 CNRS	
MAST	COMBE	JÉRÔME	-	
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx	Oui
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT	-	
Professeur Emérite	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR 5063 CNRS	
MCF Emérite	DELÉTRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON	
PR	DEMEILLIERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	Oui
ATER	DETRAIT	MAXIMIN		
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408	Oui
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	Oui
MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	Oui

Mise à jour le 07/09/2023 Sana HACHANI

STATUT	NOM	PRÉNOM	LABORATOIRE	HDR
CDD	DURVILLE	SABINE		
PU-PH	FAURE	PATRICE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042	Oui
PRCE	FITE	ANDRÉE	-	
MCU-PH	GARNAUD	CÉCILE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX	
PRAG	GAUCHARD	PIERRE-ALEXIS	-	
PU-PH	GERMI	RAPHAËLE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	Oui
MCF	GÈZE	ANNABELLE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
MCF Emérite	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
MCF	GONINDARD	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553	Oui
MCF	GRENIE	MATTHIAS	LECA – UMR CNRS 5553	
Professeure Emérite	GRILLOT	RENÉE	-	
MCF	GUIEU	VALÉRIE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	
MCU-PH	HENNEBIQUE	AURÉLIE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX	
MCF	HININGER-FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055	Oui
AHU	IHL	CORDELIA		
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	
MCF	KOTZKI	SYLVAIN	HP2 – UMR 51042	
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
PHU	LEENHARDT	JULIEN	INSERM – U1039	
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX	Oui
AHU	LEO	CAROLINE		
MAST	LOGEROT	SOPHIE		
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	Oui
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-	
MCU-PH	MINOVÉS	MÉLANIE	HP2 – INSERM U1042	
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055	Oui
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209	Oui
MCF	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR 5553 CNRS	Oui
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
AHU	PERRIER	QUENTIN		
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui

STATUT	NOM	PRÉNOM	LABORATOIRE	HDR
ATER	PEYRONNEL	CÉLIAN		
PU	RACHIDI	WALID	BGE/BIOMICS/ CEA	Oui
PU	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042	Oui
Professeure Emérite	ROUSSEL	ANNE-MARIE	-	Oui
PU-PH	SÈVE	MICHEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS	Oui
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR 5063 CNRS	Oui
MCF	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR 5075 CEA CNRS	
AHU	TRUFFOT	AURÉLIE		
MCF	VANHAVERBEKE	CÉCILE	DPM – UMR 5063 CNRS	
AHU	VITALE	ELISA		
MCF	WARTHER	DAVID	DPM – UMR 5063 CNRS	
Professeur Emérite	WOESSIDJEWÉ	DENIS	DPM – UMR 5063 CNRS	

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIB : Centre d'Innovation en Biologie

CRI : Centre de Recherche INSERM

CNRS : Centre National de Recherche Scientifique

DCE : Doctorants Contractuels Enseignement

DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

IAB : Institute for Advanced Biosciences

IBS : Institut de Biologie Structurale

LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse 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

LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique

LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

MAST : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel

MCF : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers

PAST : Professeur Associé à Temps Partiel

PRAG : Professeur Agrégé

PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement

PU : Professeur des Universités

PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers

SyMMES : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé

TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation

UMR : Unité Mixte de Recherche

UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Remerciements

Aux membres de mon jury

Au **Pr Patrice Faure**, un grand merci d'avoir accepté de présider ce jury. Je tiens également à vous remercier pour votre implication envers les internes IPR.

Au **Dr Benoit Chovelon**, merci à toi pour ton encadrement tout au long de ces quatre années d'internat, pour m'avoir formée à l'ICP-MS ainsi que pour ta disponibilité.

Au **Dr Christelle Machon**, je vous remercie pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'apporter une lecture critique sur ce travail.

À mes directeurs de thèse

Aux **Pr Eric Peyrin** et **Pr Corinne Ravelet**, merci de m'avoir accueillie aussi chaleureusement au sein de l'équipe NOVA. Eric, la chimie analytique n'était pas mon domaine de prédilection, et c'est grâce à tes cours et à ta pédagogie qu'aujourd'hui, je termine un internat et un doctorat orientés en chimie analytique. Corinne, merci à toi pour tes nombreux conseils et pour ta patience. Ces quatre années ont été passionnantes et enrichissantes, et j'ai la sensation qu'elles sont passées en un clin d'œil. Un grand merci à vous deux pour votre confiance et votre encadrement solide.

Au service des éléments traces

Un grand merci à **Dominique** et **Laurence**, les meilleures tech' ! J'ai beaucoup apprécié la bonne ambiance de notre (petite) équipe de quatre/cinq personnes, c'était très agréable de travailler avec vous. Merci pour votre expertise, que ce soit pour ce travail mais aussi pour les activités de routine. Nos discussions dans la pièce technique vont me manquer !

À mes collègues du DPM

Je vous réserve des remerciements dignes de ce nom dans l'autre thèse, mais en voici un petit avant-goût. Un grand merci à **Auriane** (ma consœur de chambre froide !), **Jordan**, **Juliette** et **Pauline**, la dream-team des doctorants de NOVA, pour m'avoir épaulée et soutenue durant la rédaction de cette thèse. Bien plus que des collègues, vous êtes devenus des amis. J'ai hâte de faire d'autres brunchs avec vous !

Je remercie également tous les permanents, le personnel administratif et le personnel technique de l'équipe pour avoir contribué à la bonne ambiance de ces quatre années.

À mes amis de pharma

Merci à toutes les personnes que j'ai rencontrées durant ces (difficiles) années de pharma et avec qui j'ai passé de bons moments en amphi. Merci à **Réjane** ma « queen diabéto » toulousaine, **Isabelle** la force tranquille, **Laura** et les après-midi jeux, **Dima** ma binôme ronéo, **Marion** ma binôme d'hépatogastro et de service sanitaire.

Spéciale dédicace à **Martial**, mon binôme depuis le premier jour. Merci à toi de m'avoir supportée lors de tous nos TP et TD, et surtout merci à toi d'avoir été mon super binôme lors des révisions du concours de l'internat, avec tes moyens mnémotechniques de fou (même si on n'a pas fait top 30 !). Tu as été un soutien indéniable durant toutes ces années, je te souhaite tout le meilleur.

Merci également à **Louay** et **Dimitri** pour avoir été de chouettes compagnons lors de la préparation du concours, j'espère que tout se passe bien pour vous.

À mes amis

Je remercie tous mes amis qui ont suivi de près ou de loin la concrétisation de ce long parcours. Un merci particulier à celles et ceux auprès de qui j'ai pu me confier et qui m'ont soutenue. Votre présence et vos encouragements m'ont été très précieux.

À ma famille

Papa, Maman, Benjamin, merci à vous d'être une famille formidable et sur qui je peux toujours compter. Vous m'avez toujours poussée à ne rien lâcher et aidée tout au long de mes études. Merci pour votre présence, votre soutien sans faille, et pour les bons « tupp » du midi. Je remercie également mes grands-parents, et globalement tous les membres de la famille qui ont toujours pris de mes nouvelles.

Enfin, merci à toi **Noam**, qui partage ma vie depuis 8 ans. Tu m'as vue évoluer et m'as accompagnée tout au long de ces années à la fac, puis lors de mon internat. Nous avons commencé et nous finissons ces études ensemble, et j'espère vivre encore tout un tas d'aventures et d'escapades à tes côtés.

Mamy, regarde, ta petite-fille est « Doc » (avec un s !)

Table des matières

Remerciements	7
Liste des figures	13
Liste des tableaux	15
Liste des abréviations	16
Introduction	19
Première partie : Bibliographie	21
1. La spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif	21
1.1. Généralités	21
1.2. Utilisation de l'ICP-MS en routine hospitalière	23
1.2.1. Dosage des éléments traces	23
1.2.2. Évaluation de l'exposition professionnelle et environnementale.....	25
1.2.3. Suivi Thérapeutique Pharmacologique	26
1.3. Utilisation de l'ICP-MS en recherche	26
1.3.1. Les autres modes d'ICP-MS	26
1.3.1.1. La spICP-MS	27
1.3.1.2. La SEC-ICP-MS	27
1.3.1.3. La CE-ICP-MS.....	28
1.3.1.4. La LA-ICP-MS	29
1.3.2. Élaboration d'essais.....	30
1.3.2.1. Conception d'immunoessais	30
1.3.2.2. Conception de tests utilisant les acides nucléiques.....	31
2. Les essais à base d'acides nucléiques	32
2.1. Généralités	32
2.1.1. Définition d'un essai	32
2.1.2. Rappels sur les acides nucléiques.....	32
2.1.3. Définition d'un oligonucléotide	36
2.2. Stratégies de marquage couramment utilisées	36
2.2.1. Marquage par des chélates métalliques	37
2.2.2. Marquage par des nanoparticules élémentaires.....	38
2.3. Détection d'acides nucléiques.....	40
2.3.1. Essais sans amplification d'acides nucléiques	40
2.3.2. Essais avec amplification d'acides nucléiques.....	44

2.3.2.1. Amplification par réaction d'hybridation en chaîne (HCR)	47
2.3.2.2. Amplification de type « rolling circle » (RCA)	49
2.4. Détection d'autres cibles à l'aide des aptamères	51
2.4.1. Généralités.....	51
2.4.2. Applications en ICP-MS	56
2.4.2.1. Détection de molécules de faible poids moléculaire.....	57
2.4.2.2. Détection de protéines.....	59
2.4.2.3. Détection de systèmes complexes.....	61
Deuxième partie : Partie expérimentale	67
1. Introduction	67
1.1. Contexte	67
1.2. Stratégie innovante de marquage	68
1.3. Concept du projet.....	69
2. Matériels et méthodes	71
2.1. Réactifs utilisés	71
2.2. Protocole expérimental	72
2.3. Approche statistique de l'analyse des données	75
3. Résultats et discussion	77
3.1. Détection de la L-tyrosinamide.....	77
3.1.1. Optimisation des conditions expérimentales.....	77
3.1.1.1. Longueur du brin d'ADNc.....	77
3.1.1.2. Conditions d'incubation avec l'acide nitrique	78
3.1.1.3. Concentration en aptamère.....	79
3.1.1.4. Conditions d'incubation du complexe aptamère-cible	81
3.1.1.5. Récapitulatif.....	82
3.1.2. Performances analytiques et spécificité	83
3.2. Détection de la thrombine	85
3.3. Tentatives d'amplification du signal.....	88
Conclusion.....	93
Références bibliographiques	96
Serment de Galien	113
Résumé	114

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique d'un instrument d'ICP-MS.	22
Figure 2. Tableau périodique des éléments.	24
Figure 3. Représentation schématique d'un appareillage LA-ICP-MS.	29
Figure 4. Exemples d'immunoessais pour le dosage de macromolécules (méthodes directes en sandwich)	31
Figure 5. Bases nucléiques retrouvées dans l'ADN et l'ARN.	33
Figure 6. Représentation de deux nucléotides reliés par une liaison phosphodiester.	34
Figure 7. Exemples de structures secondaires d'acides nucléiques	35
Figure 8. Structure des chélateurs métalliques DOTA (A) et DTPA (B).	37
Figure 9. Illustration d'une nanoparticule d'or.	39
Figure 10. Illustrations de deux stratégies multiplexées développées par l'équipe de Zhang	42
Figure 11. Illustration de la stratégie développée par Li <i>et al.</i> , utilisant le mercure (Hg) en tant que révélateur du signal.	44
Figure 12. Illustration de la stratégie développée par l'équipe de Jiang, utilisant une amplification par HCR.	48
Figure 13. Illustration de la stratégie développée par l'équipe de Hu, utilisant une amplification par RCA.	50
Figure 14. Les différentes étapes de la méthode SELEX.	52
Figure 15. Illustration de la stratégie développée par l'équipe de Xu, utilisant les aptamères pour la détection d'OTA et de FB1 par ICP-MS.	58
Figure 16. Illustration de la stratégie développée par Zhao <i>et al.</i> , utilisant les aptamères pour la détection de thrombine par ICP-MS.	60
Figure 17. Illustration de la stratégie développée par l'équipe de Fu, utilisant les aptamères pour la détection de cellules tumorales par ICP-MS.	63
Figure 18. Structure de la L-thyroxine.	68
Figure 19. Structure de la L-tyrosinamide.	69
Figure 20. Représentation schématique de la détection de petites molécules par dosage des atomes d'iode en ICP-MS.	70
Figure 21. Résultats du dosage de l'iode urinaire du laboratoire du CHU de Grenoble en fonction des valeurs cibles du CDC.	74
Figure 22. Courbes dose-réponse avec évaluation de deux ADNc (3'Biot-BC10 et 3'Biot-BC14).	78

Figure 23. Effets de la dilution de l'acide nitrique ajouté aux puits (50% <i>versus</i> 100%) et du temps d'incubation (40 min <i>versus</i> 15 h) sur la dissociation de l'hybride formé par l'ADNc et l'aptamère, en l'absence de la cible.....	79
Figure 24. Courbes dose-réponse avec évaluation de différentes concentrations de 5'Thyr-Apt-Tym.	80
Figure 25. Courbes dose-réponse avec évaluation de trois temps d'incubation aptamère-cible.	81
Figure 26. Courbes dose-réponse avec évaluation de deux températures d'incubation aptamère-cible (25°C et 4°C).	82
Figure 27. Courbes dose-réponse pour la détection de L-Tym (issue de la Figure 26), et évaluation de la spécificité.	84
Figure 28. Évaluation des interférences potentielles par l'étude du signal d'iode provenant de différentes expériences de contrôle.	85
Figure 29. Représentation schématique de la détection de protéines par dosage des atomes d'iode en ICP-MS.....	86
Figure 30. Courbes dose-réponse pour la détection de thrombine, avec évaluation de la spécificité et test en milieu urinaire.....	87
Figure 31. Séquence de l'oligonucléotide composé de l'aptamère anti-L-Tym et d'un poly-iodo-C.....	89
Figure 32. Représentation de la liaison halogène entre un atome d'iode provenant d'une cytosine et un atome d'oxygène d'un groupement phosphate d'une adénine.....	89
Figure 33. Représentation de l'oligonucléotide composé de l'aptamère anti-L-Tym et d'un poly-iodo-U selon le logiciel Mfold.	90
Figure 34. Courbes dose-réponse pour la détection de L-Tym avec utilisation d'un oligonucléotide Poly-iodoU-Apt-Tym.	91

Liste des tableaux

Tableau 1. Synthèse des essais par techniques d'hybridation pour la détection d'acides nucléiques par ICP-MS.	40
Tableau 2. Synthèse des essais par techniques d'hybridation avec amplification pour la détection d'acides nucléiques par ICP-MS.	46
Tableau 3. Avantages des aptamères par rapport aux anticorps conventionnels.	55
Tableau 4. Synthèse des essais à base d'aptamères avec détection par ICP-MS.	56
Tableau 5. Séquences et abréviations des oligonucléotides utilisés pour la détection de L-Tym.	72
Tableau 6. Seuils acceptables fixés par le CDC pour le dosage de l'iode urinaire.	74
Tableau 7. Concentrations en iode normalisées obtenues avec deux ADNc (3'Biot-BC10 et 3'Biot-BC14).	78
Tableau 8. Valeurs de $K_{1/2}$ estimées pour le 5'Thyr-Apt-Tym et la L-tyrosinamide.	81
Tableau 9. Tableau récapitulatif des conditions expérimentales testées et optimales.	83
Tableau 10. Séquences et abréviations des oligonucléotides utilisés pour la détection de thrombine	86

Liste des abréviations

ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique
AFP	Alpha-fœtoprotéine
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Albumine de sérum bovin (Bovine serum albumine)
CDC	Centre pour le contrôle et la prévention des maladies (Centers for Disease Control and Prevention)
CE	Électrophorèse capillaire (Capillary electrophoresis)
CEA	Antigène carcino-embryonnaire
CHA	Assemblage catalytique d'hairpins (Catalytic hairpin assembly)
CLIA	Chemiluminescence immunoassay
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CTC	Cellules tumorales circulantes
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DOTA	Acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-tétraacétique
DSN	Duplex-specific nuclease
DTPA	Acide diéthylènetriamine-pentaacétique
DTTA	Acide diéthylènetriamine-tétraacétique
EDC	Entropy-driven circuit
EEQ	Évaluation externe de la qualité
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FB1	Fumonisine B1
GO	Oxyde de graphène (Graphene oxide)
HCR	Réaction d'hybridation en chaîne (Hybridization chain reaction)
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
ICP-MS	Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif
IgM	Immunoglobuline M
ITC	Titration calorimétrique isotherme (Isothermal titration calorimetry)
LA	Ablation au laser (Laser ablation)

LAMP	Amplification isotherme médiée par les boucles (Loop-mediated isothermal amplification)
LCR	Réaction de ligature en chaîne (Ligase chain reaction)
LDR	Réaction de détection par ligature (Ligase detection reaction)
LFA	Chromatographie à flux latéral (Lateral Flow Assay)
LMA	Amplification médiée par ligature (Ligase-mediated amplification)
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight
MNAzyme	Multicomponent nucleic acid enzyme
NC	Nanocluster
NP	Nanoparticule
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OTA	Ochratoxine A
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase chain reaction)
QD	Quantum dot
RCA	Amplification de type « rolling circle » (Rolling-circle amplification)
RIA	Radioimmunoassay
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère
SDA	Amplification par déplacement de brin (Strand displacement amplification)
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique (Size-exclusion chromatography)
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
spICP-MS	Analyse de particules individuelles par ICP-MS (Single-particle ICP-MS)
SPR	Résonance plasmonique de surface (Surface plasmon resonance)
STP	Suivi Thérapeutique et Pharmacologique
TSH	Thyréostimuline
UCNP	Nanoparticules à conversion ascendante de photons (Upconverting nanoparticles)
UFC	Unité formant colonie
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VHA	Virus de l'hépatite A
VHB	Virus de l'hépatite B
VPH	Virus du papillome humain

Introduction

Le développement de biocapteurs et d'essais pour la détection de molécules spécifiques constitue un sujet de recherche majeur dans les domaines de la santé publique, de la protection environnementale ou encore de la sécurité alimentaire. Bien que les immunoessais représentent les méthodes d'analyse les plus couramment utilisées en routine, leur manque de spécificité et leur complexité de manipulation peuvent être limitants. Les biocapteurs et essais utilisant les acides nucléiques en tant qu'agents de reconnaissance sont apparus comme une alternative prometteuse, offrant une spécificité et une sensibilité accrues ainsi qu'une facilité d'utilisation. Les aptamères, des oligonucléotides synthétiques se liant spécifiquement et de manière très affine à des cibles précises, se révèlent être des agents de reconnaissance particulièrement intéressants pour la conception de ce type de méthodes d'analyse. Une grande variété de méthodologies de détection à base d'aptamères ont été décrits au cours des vingt dernières années, reposant notamment sur des approches colorimétriques, luminescentes ou électrochimiques. En raison de sa très grande sensibilité et spécificité, la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) semble être une technique d'analyse performante pour l'élaboration d'essais diagnostiques.

Cette thèse se divise en deux parties. La première partie explore les avancées récentes dans le domaine des essais diagnostiques à base d'acides nucléiques, avec une section consacrée aux aptamères, et aborde leurs applications dans la détection de différents types d'espèces. La seconde partie se concentre sur le développement d'une preuve de concept d'un essai à base d'aptamère pour la détection de deux cibles, utilisant l'ICP-MS comme technique d'analyse ainsi qu'un marqueur de révélation du signal innovant.

Première partie : Bibliographie

1. La spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif

1.1. Généralités

La spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) est une technique développée en 1980 par Houk *et al.*¹, permettant l'analyse élémentaire à l'état de traces. Elle est couramment utilisée en milieu hospitalier pour évaluer l'état nutritionnel des patients ou pour surveiller l'exposition professionnelle ou environnementale à certains éléments métalliques spécifiques.² Elle est également employée dans de nombreuses autres disciplines telles que la médecine légale, l'évaluation de la qualité des aliments ainsi que l'archéologie.³⁻⁵

Le schéma de fonctionnement d'un instrument d'ICP-MS est décrit dans la Figure 1. L'échantillon biologique à analyser est introduit sous forme de solution dans un système d'introduction. Ce système est généralement constitué d'un capillaire et d'une pompe péristaltique, qui propulsent l'échantillon dans un flux d'argon. L'aérosol résultant est ensuite acheminé jusqu'à la chambre de nébulisation, où les gouttelettes dont le diamètre est supérieur à 10 μm sont éliminées. Les plus fines passent ensuite dans une torche à plasma d'argon fonctionnant à une température d'environ 8000 K (soit 7726,85 °C) et à une pression de 10^5 Pa, qui atomise et ionise les éléments constituant l'aérosol. La plupart des éléments de l'échantillon sont ionisés à plus de 90%, excepté le carbone, l'oxygène, l'hydrogène, l'azote, le soufre, le mercure ainsi que les halogènes, qui ne sont que partiellement ionisés en raison de leur énergie d'ionisation élevée.

Les ions ainsi générés sont ensuite transportés vers une interface composée de deux cônes métalliques. Le premier, appelé « sampler » ou échantillonneur, permet d'extraire les ions du plasma, tandis que le second, appelé « skimmer » ou écrêteur, prélève les ions situés au cœur du plasma. Ces cônes sont suivis par une optique ionique constituée de lentilles électrostatiques

dont le rôle est de stopper les photons et de concentrer les ions dans un petit volume. Cette interface permet de passer d'un environnement aux conditions de température extrêmement élevée et à pression atmosphérique à un environnement à température ambiante et à très basse pression ($< 10^{-3}$ Pa).

Enfin, les ions sont acheminés vers l'analyseur de masse, classiquement un quadripôle, où ils sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) avant d'être détectés par comptage à la masse souhaitée.^{4,6-8}

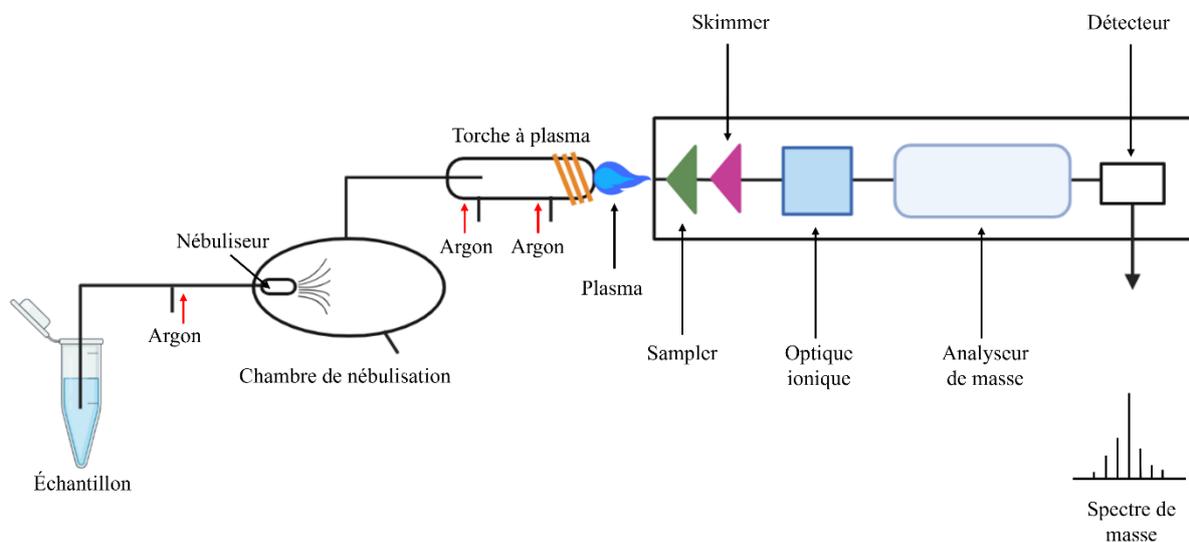


Figure 1. Représentation schématique d'un instrument d'ICP-MS.

Cette technologie offre un certain nombre d'avantages, tels que la capacité à doser rapidement et simultanément jusqu'à 75 éléments avec un degré élevé de sensibilité, de spécificité et de précision. Elle présente également un excellent pouvoir de résolution, c'est-à-dire une très bonne capacité à différencier des éléments de masses très proches. Elle permet d'atteindre des limites de détection basses (de l'ordre du ng.L^{-1}) avec de larges gammes dynamiques de concentration couvrant jusqu'à 8 ordres de grandeur, tout en réduisant considérablement le bruit de fond causé par des effets de matrice. L'appareil est également capable d'analyser plusieurs échantillons à une cadence élevée, permettant d'effectuer des

dosages en grande série, tout en consommant de petits volumes (quelques centaines de microlitres). La réalisation de mesures isotopiques est également possible et a montré son utilité dans la spéciation des métaux.⁷⁻¹⁰

1.2. Utilisation de l'ICP-MS en routine hospitalière

1.2.1. Dosage des éléments traces

Les éléments traces sont des composés naturellement présents en faibles concentrations chez les organismes vivants et dont les apports proviennent de l'environnement et de l'alimentation. Certains d'entre eux, notamment le fer (Fe), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le sélénium (Se), le manganèse (Mn), le cobalt (Co), le molybdène (Mo) et l'iode (I), sont considérés comme « essentiels » pour l'humain (Figure 2).¹¹ Pour qu'un élément soit classé comme « essentiel », celui-ci doit remplir plusieurs critères :

- Il doit être présent dans les tissus humains,
- Son absence totale dans l'organisme provoque des dommages graves et irréversibles au niveau de fonctions vitales,
- Ces dommages peuvent être réduits par une supplémentation appropriée de l'élément concerné.¹²

1																	2									
H																	He									
3	4											5	6	7	8	9	10									
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne									
11	12											13	14	15	16	17	18									
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar									
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36									
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr									
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54									
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe									
55	56											72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86
Cs	Ba											Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
87	88											104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118
Fr	Ra											Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Cn	Nh	Fl	Mc	Lv	Ts	Og
Lanthanides		57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71										
		La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu										
Actinides		89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103										
		Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr										

Figure 2. Tableau périodique des éléments. Les éléments traces essentiels sont représentés en bleu.

Malgré leur faible concentration représentant seulement 0,02% du poids total du corps, les éléments traces jouent un rôle crucial dans de nombreuses fonctions biologiques. Ils sont impliqués dans des processus tels que la synthèse hormonale, le transfert d'électrons, ou encore la stabilisation de structures enzymatiques et protéiques.^{7,11} À titre d'exemple, l'iode est nécessaire à la synthèse des hormones thyroïdiennes, qui elles-mêmes régulent de nombreuses fonctions vitales de l'organisme.

Un grand nombre d'entre eux sont des cofacteurs ou des composants de protéines et d'enzymes importantes. Le fer est un constituant majeur de l'hémoglobine, protéine essentielle au transport d'oxygène, et est également impliqué dans des centaines de réactions enzymatiques. Le cobalt est indispensable à la synthèse de la vitamine B12 (ou cobalamine) et à la production de globules rouges. Le zinc fait partie intégrante de plusieurs métalloprotéinases associées à des fonctions neurologiques, immunitaires ou encore dermatologiques, et joue un rôle important dans la stabilisation de structure tertiaire de certaines protéines appelées « protéines à doigt de

zinc », impliquées dans la régulation de l'expression de gènes. Le molybdène est un élément important du site actif de la xanthine oxydase et de l'aldéhyde oxydase, respectivement responsables du métabolisme de l'acide urique et de l'alcool. Le cuivre et le manganèse interviennent dans l'activité de diverses enzymes en tant que cofacteurs. Le sélénium quant à lui, entre dans la constitution de nombreuses protéines sous forme de sélénocystéine ou sélénométhionine.^{8,11,12}

En relation avec leurs nombreuses fonctions diverses et variées, les déficiences ou les surcharges de ces éléments traces peuvent être responsables de désordres au niveau neurologique, hépatique, cardiaque ou encore hématologique, ou être causées par certaines pathologies. La cardiomyopathie de Keshan est directement liée à une carence importante en sélénium.¹³ L'hémochromatose de type 1, caractérisée par une mutation sur le gène codant pour la protéine HFE, est à l'origine d'une hyperabsorption et d'une accumulation progressive de fer et peut conduire à des troubles hépatiques, cardiaques et métaboliques.¹⁴ La maladie de Wilson est due au dysfonctionnement d'une protéine hépatique permettant l'excrétion biliaire du cuivre, entraînant son accumulation dans divers organes.^{15,16}

1.2.2. Évaluation de l'exposition professionnelle et environnementale

Par opposition aux éléments traces essentiels pour notre organisme, d'autres éléments tels que l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le mercure (Hg) et le plomb (Pb) sont connus pour exercer des effets toxiques tout en n'ayant aucun rôle biologique bénéfique. Ces métaux se lient à des sites de liaison protéiques en déplaçant les métaux originellement liés, perturbant ainsi de nombreux processus métaboliques.¹⁷ À cause de leur caractère carcinogène ainsi que de leur toxicité systémique aiguë et chronique, ils sont considérés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme faisant partie de la liste des dix produits chimiques extrêmement

préoccupants pour la santé publique. De nombreuses sources de contamination ont été identifiées et font l'objet de mesures spécifiques prises par l'OMS.¹⁸⁻²⁰

1.2.3. Suivi Thérapeutique Pharmacologique

Le Suivi Thérapeutique Pharmacologique (STP) est réalisé pour surveiller les concentrations de certains médicaments chez les patients afin d'évaluer l'observance, l'efficacité thérapeutique ou encore leur toxicité. Le STP apporte des informations sur la pharmacocinétique du médicament, utiles pour prédire la réponse optimale au traitement ou pour ajuster le schéma posologique.²¹ Par exemple, le lithium (Li) est un médicament à marge thérapeutique étroite utilisé pour le traitement des troubles bipolaires, nécessitant des dosages réguliers pour atteindre la concentration thérapeutique.^{22,23} Chez les patients traités par amiodarone, une surveillance de la surcharge iodée peut être mise en place.²⁴ Enfin, les molécules anticancéreuses dérivées du platine (cisplatine, carboplatine, oxaliplatine) ou contenant de l'arsenic (trioxyde d'arsenic) peuvent faire l'objet d'un STP au vu de leurs effets indésirables importants.^{25,26}

1.3. Utilisation de l'ICP-MS en recherche

1.3.1. Les autres modes d'ICP-MS

Une caractéristique intéressante qui fait de l'ICP-MS un outil polyvalent est la possibilité de modifier le mode d'acquisition du signal, ou de combiner plusieurs technologies telles que des techniques de séparation ou diverses méthodes d'introduction d'échantillons. Quelques-unes d'entre elles seront développées dans les sous-parties suivantes.

1.3.1.1. La spICP-MS

L'analyse de particules individuelles par ICP-MS (spICP-MS pour « Single particle ICP-MS ») est un mode de fonctionnement spécial mis en place pour détecter et compter des nanoparticules dans des suspensions très diluées. Cette méthode a été proposée au début des années 2000 par Degueldre *et al.* pour analyser des colloïdes élémentaires présents dans l'eau.²⁷⁻²⁹

Le fonctionnement est similaire à celui de l'ICP-MS classique, cependant le signal est mesuré de telle sorte que chaque acquisition corresponde à une seule nanoparticule. Ainsi, la mesure de la fréquence des impulsions reflète directement la concentration en particules, tandis que des informations sur leur taille sont apportées par la mesure de l'intensité de ces impulsions.³⁰ L'agrégation des nanoparticules entraîne à la fois une augmentation de la taille à l'échelle individuelle et une diminution de la concentration de l'ensemble de la population.³¹ Ces changements peuvent ainsi être identifiés par spICP-MS, ce qui améliore la sensibilité et la quantification des nanoparticules par rapport à une méthode d'ICP-MS classique.^{32,33} C'est pourquoi un certain nombre d'applications de cette technique se sont concentrées sur la caractérisation et la quantification directe des nanoparticules dans des échantillons environnementaux ou biologiques.^{30,34,35} Certaines équipes ont également montré qu'il existait un potentiel intéressant de la spICP-MS pour le développement d'essais ultrasensibles pour la détection de protéines ou d'acides nucléiques.³⁶⁻⁴¹

1.3.1.2. La SEC-ICP-MS

Un système de chromatographie liquide à haute performance (CLHP ou HPLC) couplé à l'appareil d'ICP-MS peut être utilisé pour effectuer des analyses par chromatographie d'exclusion stérique (SEC-ICP-MS). Cette méthode est particulièrement adaptée à la recherche sur les métaux, notamment ceux qui sont liés à des biomolécules ou qui composent des protéines

(métalloprotéines). La SEC permet de séparer ces protéines en fonction de leur taille, qui seront ensuite détectées par ICP-MS grâce à l'analyse élémentaire. Les différents temps de rétention obtenus permettent de distinguer et de quantifier les différentes espèces élémentaires présentes dans un échantillon particulier.^{42,43}

Le couplage de ces deux techniques est une méthode de choix pour réaliser des analyses de spéciation dans les fluides biologiques ou les échantillons alimentaires.^{43,44} De plus, elle peut également être utile dans le développement de médicaments en évaluant la liaison des métaux à certaines protéines thérapeutiques,^{45,46} ou dans l'élaboration d'essais pour la détermination simultanée de protéines ou d'acides nucléiques.^{47,48}

1.3.1.3. La CE-ICP-MS

L'électrophorèse capillaire (CE) se distingue des techniques chromatographiques en séparant les composés en fonction de leur rapport charge/masse à l'intérieur d'un petit tube capillaire rempli d'un électrolyte conducteur, sous l'influence d'un champ électrique.⁴⁹ Son couplage avec l'ICP-MS offre divers avantages pour les études de spéciation élémentaire, comme la possibilité d'utiliser des conditions de séparation douces, notamment le choix d'un tampon de migration avec un pH et une composition compatibles pour garantir la préservation de l'intégrité des espèces. De plus, les potentielles interactions avec la phase stationnaire retrouvées dans les méthodes chromatographiques et qui pourraient altérer certaines espèces d'intérêt (notamment les complexes métaux-ligands) sont évitées puisque les séparations par CE sont basées sur la mobilité des analytes en solution, sous l'action d'un champ électrique.⁵⁰ De faibles quantités d'échantillons et de réactifs sont consommées (à hauteur de quelques nanolitres), mais peuvent par conséquent conduire à des limites de détection (LOD) trop élevées. Ce problème peut néanmoins être résolu par des modifications de l'instrumentation ou de la méthodologie. Un design adéquat du système de CE-ICP-MS est nécessaire pour

minimiser certaines limites, comme par exemple l'ajout d'une interface avant le nébuleur, l'utilisation de micro-nébuleurs pour assurer la stabilité de la séparation, ou encore l'insertion d'une interface basée sur la génération d'espèces volatiles pour éviter l'utilisation de nébuleurs.⁵¹ Quelques articles scientifiques ont fait état de la mise au point de méthodes utilisant la CE-ICP-MS pour la détection de biomolécules. À titre d'exemple, l'équipe de Fu a été en mesure de quantifier le lysozyme et la saxitoxine en procédant à un marquage direct de l'analyte par un chélate métallique *via* les résidus amine.^{52,53}

1.3.1.4. La LA-ICP-MS

L'analyse d'échantillons solides peut être effectuée par une stratégie spécifique d'introduction d'échantillons appelée ablation au laser (LA). En présence d'un gaz « transporteur » (généralement de l'argon), un faisceau laser est appliqué à l'échantillon, produisant des photons à haute énergie qui sont convertis en énergie thermique, provoquant l'ablation et la vaporisation du matériel. L'aérosol ainsi généré est ensuite transféré dans le système ICP par le flux constant de gaz (Figure 3).⁵⁴ Outre les avantages analytiques de l'ICP-MS, cette technique permet également une préparation plus rapide des échantillons, une consommation moindre de volumes ainsi que la possibilité d'éviter les réactifs dangereux servant à la digestion des échantillons.^{55,56}

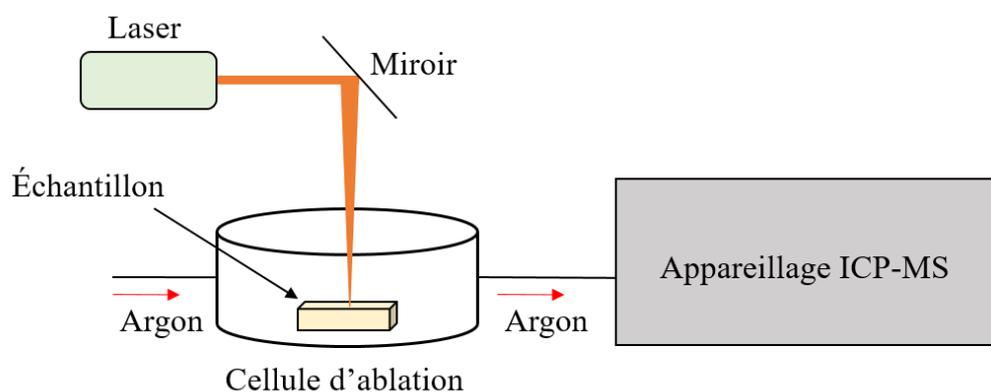


Figure 3. Représentation schématique d'un appareillage LA-ICP-MS.

La technique de LA-ICP-MS est excellente pour les études géologiques et environnementales telles que les inclusions rocheuses, les anneaux de croissance des arbres, les particules en suspension dans l'air, ou encore l'étude des sols. Elle se révèle également très pertinente pour l'analyse ou l'imagerie de tissus biologiques, le domaine médico-légal avec par exemple la confirmation de l'authenticité d'objets anciens ou l'identification du verre et de la peinture, ainsi que pour les mesures isotopiques de radionucléides à longue durée de vie.⁵⁴⁻⁵⁹

1.3.2. Élaboration d'essais

Les applications en routine de la technique d'ICP-MS décrites précédemment ont ouvert de nombreuses possibilités dans le domaine de la recherche, notamment pour le développement de méthodes innovantes de dosage de biomolécules.

1.3.2.1. Conception d'immunoessais

Les immunoessais, ou immunodosages, sont des techniques permettant la détection d'une molécule spécifique dans un échantillon en utilisant la réaction entre un antigène et un ou plusieurs anticorps.⁶⁰ En 1959, l'équipe de Yalow et Berson a mis au point le premier dosage de protéine par radio-immunoanalyse (RIA),⁶¹ puis d'autres méthodes basées sur l'utilisation d'enzymes (ELISA) ou de la chimiluminescence (CLIA) ont été développées au cours des décennies suivantes (Figure 4). Le premier immunodosage par ICP-MS a été introduit en 2001 par Zhang *et al.* pour le dosage de la thyroïdostimuline (TSH) grâce à l'utilisation d'un anticorps de détection marqué par un atome d'euprimum (Eu).⁶² Ce type d'analyse est de plus en plus populaire étant donné qu'il ne nécessite pas l'utilisation de marqueurs radioactifs, optiques, électrochimiques ou avec toute autre propriété particulière. De plus, l'important pouvoir de résolution qu'offre cette technique permet de doser simultanément plusieurs cibles biologiques

différentes (« analyse multiplexée »). Plusieurs revues de la littérature ont répertorié un nombre significatif d'immunosages par ICP-MS développés pour la détection d'une grande variété d'analytes tels que des petites molécules, des protéines, des acides nucléiques ainsi que des cellules et des microorganismes.^{9,10,63,64}

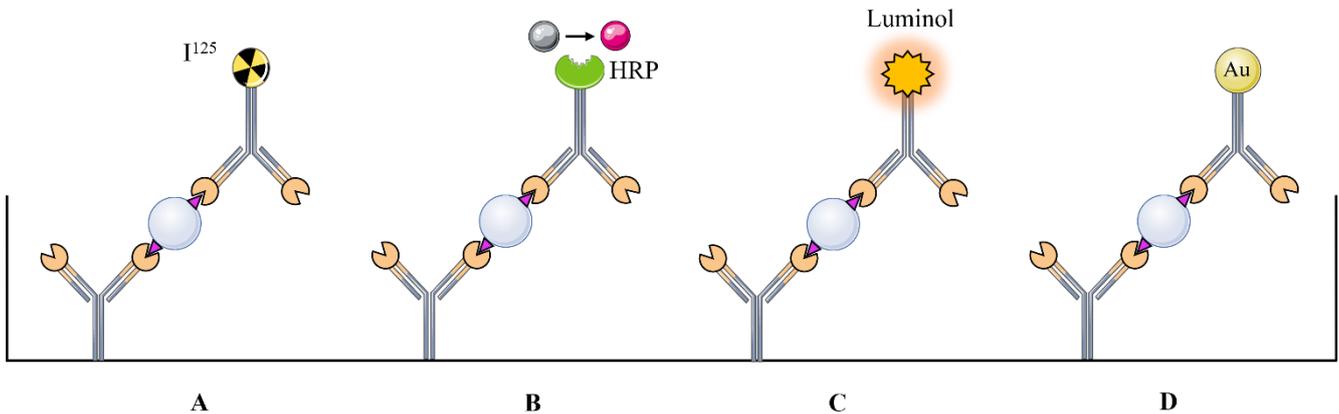


Figure 4. Exemples d'immunoessais pour le dosage de macromolécules (méthodes directes en sandwich) : RIA (A), ELISA (B), CLIA (C) et ICP-MS-IA (D).

1.3.2.2. Conception de tests utilisant les acides nucléiques

À côté des méthodes de dosage à base d'anticorps, des techniques utilisant les acides nucléiques en tant qu'éléments de reconnaissance ont été déployées, ayant pour objectif premier de détecter du matériel génétique viral ou bactérien mais également humain, avec par exemple des biomarqueurs liés à l'apparition de certains cancers. Les applications ont ensuite été étendues à la détection d'autres types de cibles biologiques grâce à l'emploi d'aptamères. La partie suivante de ce manuscrit sera consacrée à la description de ce type d'essais ainsi que des différentes applications retrouvées dans la littérature.

2. Les essais à base d'acides nucléiques

2.1. Généralités

2.1.1. Définition d'un essai

Le terme « essai » fait référence à un ensemble de techniques de dosage qui impliquent l'utilisation d'un élément de reconnaissance tel qu'une enzyme, un anticorps ou un acide nucléique, pour évaluer de manière qualitative, semi-quantitative ou quantitative la présence d'un analyte dans un échantillon.⁶⁵ Ces tests peuvent être réalisés en phase hétérogène, où l'élément de reconnaissance est immobilisé sur un support comme la paroi d'un tube, une bille magnétique ou le puits d'une microplaque. Ils peuvent également être effectués en phase homogène, où la réaction a lieu en solution sans nécessiter d'étape de séparation ou de lavage.⁶⁶ Un certain nombre d'essais ont été adaptés sous forme de dispositifs diagnostiques « point-of-care », notamment les méthodes de chromatographie sur bandelette à flux latéral, également connues sous le nom de « Lateral Flow Assay » (LFA).⁶⁷

2.1.2. Rappels sur les acides nucléiques^{68,69}

Un acide nucléique est un polymère formé par une succession de molécules appelées nucléotides. On distingue deux types d'acides nucléiques :

- L'acide désoxyribonucléique (ADN) est le support de l'information génétique et compose l'ensemble du génome. La chaîne est constituée d'une succession de bases azotées de nature purique, l'adénine (A) et la guanine (G), et pyrimidique, la cytosine (C) et la thymine (T). Elles sont présentées dans la Figure 5 ci-dessous.

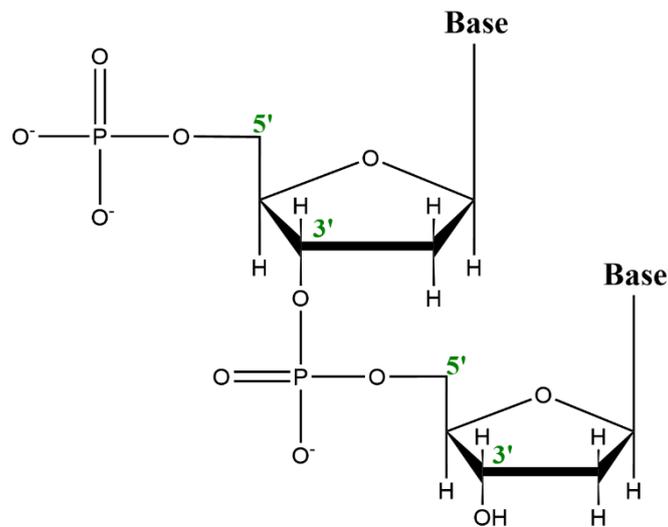


Figure 6. Représentation de deux nucléotides reliés par une liaison phosphodiester.

Dans les organismes vivants, l'ADN existe principalement sous forme bicaténaire. En effet, deux brins peuvent s'associer par complémentarité A-T et G-C *via* deux ou trois liaisons hydrogène respectivement. Cette association est appelée « appariement de Watson-Crick » et permet la formation d'une configuration en double hélice. Les bases azotées sont situées au centre tandis que les phosphates sont disposés à l'extérieur sous forme déprotonée, conférant à l'ADN une charge négative.

- L'acide ribonucléique (ARN) est constitué par les mêmes unités que l'ADN, à l'exception de la thymine qui est remplacée par l'uracile (U), une autre base pyrimidique (Figure 5). Le sucre utilisé pour former les nucléosides est le ribose, qui contient un groupement hydroxyle (-OH) en position 2.

Sur le plan fonctionnel, l'ARN est retrouvé généralement sous forme monocaténaire (simple brin) et courte. Il existe plusieurs types d'ARN tels que l'ARN messager (ARNm), l'ARN de

transfert (ARNt), l'ARN ribosomique (ARNr) ou encore les micro-ARNs (miARN), qui remplissent de nombreuses fonctions biologiques dont la synthèse protéique.

Les acides nucléiques, et notamment les aptamères que nous décrirons plus tard, sont capables d'adopter plusieurs structures différentes. La structure primaire définit simplement la séquence de nucléotides. La structure secondaire correspond au repliement intracaténaire par le biais d'appariements internes entre bases complémentaires au sein d'une molécule simple brin, formant ainsi des motifs particuliers comme par exemple une tige-boucle ou « épingle à cheveux » (hairpin), ou un pseudonoeud. D'autres motifs tels que le G-quadruplex reposent sur des appariements particuliers de type « Hoogsteen », avec des interactions entre plusieurs guanines (Figure 7). La structure tertiaire, quant à elle, caractérise principalement la formation de la double hélice par appariements intercaténaire.

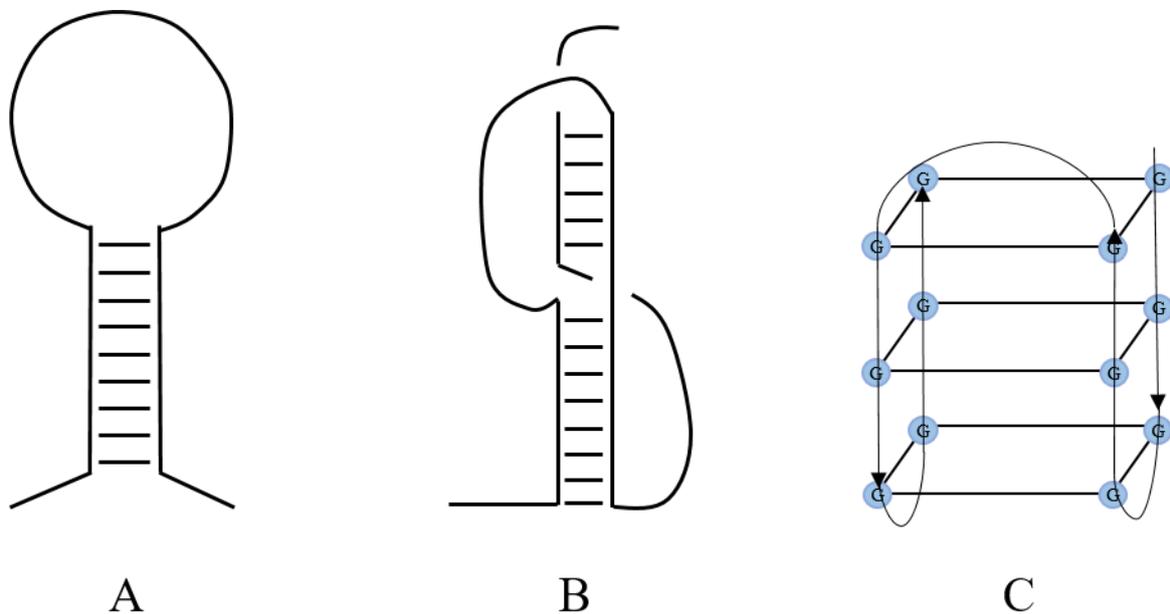


Figure 7. Exemples de structures secondaires d'acides nucléiques : Tige-boucle (A), Pseudonoeud (B) et G-quadruplex (C).

2.1.3. Définition d'un oligonucléotide⁷⁰

Les oligonucléotides sont de courtes séquences de quelques dizaines de nucléotides, synthétisées en laboratoire à moindre coût sous forme de simple brin, en série ADN ou ARN. L'ordre des nucléotides peut être préalablement établi de façon à obtenir une sonde capable de s'hybrider avec une séquence complémentaire ou de reconnaître un ligand précis. Leur obtention par voie synthétique permet de les fonctionnaliser en incorporant divers groupements tels que des amines ou des thiols, ou encore des molécules comme la biotine. De plus, il est possible de les marquer avec une molécule radioactive ou fluorescente, voire avec un élément métallique dans le cas d'un essai avec analyse par ICP-MS.

Les techniques d'hybridation d'acides nucléiques dans le cadre du développement de méthodes d'analyse ou de dispositifs tels que la PCR ou les puces à ADN ont connu un essor considérable au cours des dernières décennies, motivant l'automatisation de la synthèse d'oligonucléotides.

2.2. Stratégies de marquage couramment utilisées

Le carbone, l'hydrogène, l'oxygène et l'azote sont les principaux constituants des biomolécules. Cependant, la sensibilité de l'ICP-MS pour ces éléments s'avère être faible, ce qui l'empêche de détecter directement ces espèces.⁵³ Le phosphore (P), hétéroélément naturel intégré de manière covalente dans les acides nucléiques, a d'abord été utilisé comme marqueur élémentaire endogène pour les quantifier.⁷¹⁻⁷⁴ Toutefois, ce type d'élément est difficile à détecter en raison de son premier potentiel d'ionisation élevé et donc de sa faible efficacité d'ionisation ou encore de la possibilité d'interférences polyatomiques pouvant réduire la sensibilité de l'appareil.⁹

Par conséquent, le marquage exogène avec des métaux ou ions métalliques est généralement nécessaire pour quantifier les analytes d'intérêt de manière sensible et précise. Les stratégies de marquage les plus fréquemment rencontrées lors du développement de

méthodes de dosage par ICP-MS utilisant les acides nucléiques en tant qu'éléments de reconnaissance sont résumées dans cette section.

2.2.1. Marquage par des chélates métalliques

La stratégie de marquage par l'utilisation de chélates métalliques emploie généralement des agents chélateurs de structure macrocyclique ou linéaire tels que l'acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-tétraacétique (DOTA) ou l'acide diéthylènetriamine-pentaacétique (DTPA), dont les structures sont présentées dans la Figure 8. Ces derniers peuvent être attachés de manière covalente aux groupes réactifs des biomolécules par un processus de bioconjugaison, et complexer simultanément de nombreux ions métalliques.^{9,52}

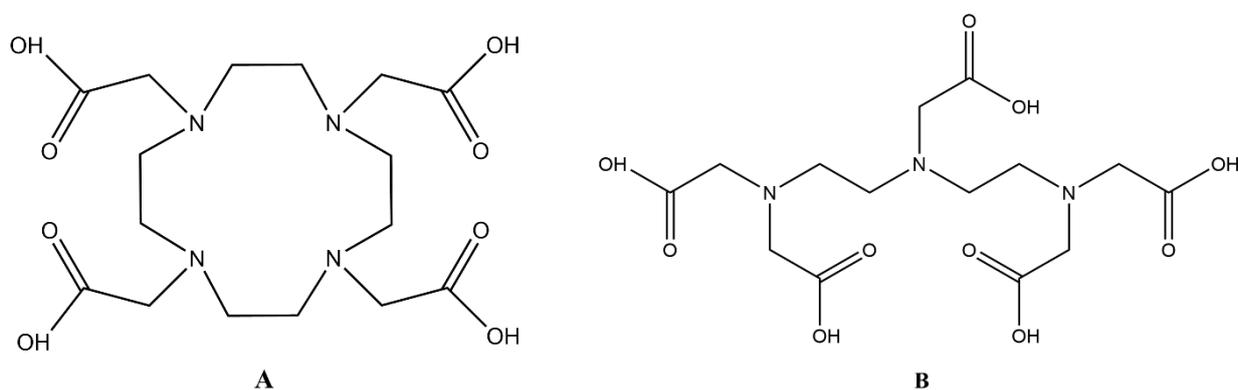


Figure 8. Structure des chélateurs métalliques DOTA (A) et DTPA (B).

Parmi les éléments susceptibles d'être complexés, les lanthanides sont fréquemment utilisés en raison de leur quasi-absence dans les matrices biologiques ainsi que de leur grande capacité d'ionisation. De plus, ce groupe contient 14 éléments non radioactifs pouvant être porté à 38 en ajoutant leurs isotopes associés, facilitant la conception de méthodes d'analyse multiplexée.^{75,76} La méthode de quantification de la TSH développée par Zhang *et al.* en 2001 a été la première à utiliser de l'euprium chélaté avec l'acide diéthylènetriamine-tétraacétique

(DTTA) fixé sur l'anticorps de détection.⁶² Depuis lors, cette approche a été largement employée pour le développement d'essais à base d'acides nucléiques.⁷⁷⁻⁸⁰

Dans l'ensemble, cette stratégie de marquage s'avère être simple et pratique, mais la sensibilité est généralement limitée par la faible capacité de liaison aux ions métalliques qu'offre les agents chélateurs.⁹ Un moyen de pallier ce problème consiste à concevoir des polymères chélateurs comprenant plusieurs unités de DOTA ou DTPA, et permettant l'incorporation d'une grande quantité d'ions métalliques pouvant aller de 30 à 80 ions lanthanides.⁷⁵ Toutefois, ce type d'approche reste assez difficile à mettre au point et peut entraîner une augmentation significative du bruit de fond, limitant ainsi son application pour le développement d'immunodosages.^{9,81}

2.2.2. Marquage par des nanoparticules élémentaires

La sensibilité peut également être grandement améliorée par l'utilisation de nanoparticules (NPs) élémentaires, étant donné qu'une seule nanoparticule peut contenir des milliers d'atomes métalliques.^{9,71} Les nanoparticules d'or (AuNPs) sont les plus populaires en raison de leur bonne biocompatibilité, de leur surface élevée et de leur faible présence dans les échantillons biologiques (Figure 9). En outre, leur processus de synthèse est bien documenté. Étant donné qu'une seule AuNP de 10 nm contient environ 30 000 atomes d'or, une forte amplification du signal est attendue, ce qui en fait d'excellents candidats pour la détection de faibles quantités de biomolécules.^{76,82} Compte tenu de ces propriétés, une grande variété de méthodes de dosage par ICP-MS à base d'acides nucléiques employant des AuNPs en tant que marqueurs élémentaires ont été décrites depuis 2009.^{31,83-85}

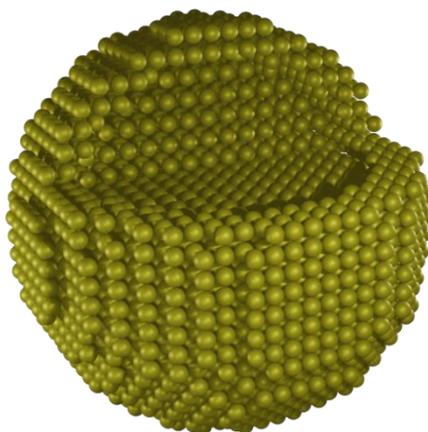


Figure 9. Illustration d'une nanoparticule d'or. Modélisée sur le logiciel Blender.

De nombreux autres éléments ont également été étudiés, tels que l'argent (Ag),^{86,87} le platine (Pt),^{41,88} le cuivre (Cu),⁸⁹ le palladium (Pd)⁹⁰ ou encore les lanthanides,⁹¹ mais aussi d'autres types de nanoparticules telles que les nanoparticules à conversion ascendante de photons (UCNPs),^{92,93} les nanoparticules de silice dopées aux métaux ou encore les quantum dots (QDs).⁹⁴ De plus, une détection multimodale peut être effectuée si les nanoparticules possèdent une émission de fluorescence intrinsèque ; en effet, les nanoclusters métalliques (NCs)^{95,96} permettent à la fois l'imagerie par fluorescence et la quantification par ICP-MS.

Malgré la grande sensibilité obtenue par ce type de marqueur, il est important de tenir compte de certains inconvénients, notamment la nécessité d'avoir une répartition homogène des tailles ainsi que le besoin d'un nombre important de contrôle des conditions de synthèse.⁹⁷ De plus, les nanoparticules élémentaires possèdent souvent une forte affinité avec la surface des flacons, pouvant entraîner une adsorption non spécifique et donc un bruit de fond non négligeable.⁷¹

2.3. Détection d'acides nucléiques

Cette section est consacrée aux différents essais développés pour la détection quantitative d'ADN et d'ARN par des techniques d'hybridation, avec utilisation ou non de méthodes d'amplification d'acides nucléiques.

2.3.1. Essais sans amplification d'acides nucléiques

À ce jour, 13 publications ayant pour objectif la quantification d'acides nucléiques par technique d'hybridation sans amplification ont été recensées dans la littérature, et sont résumées dans le Tableau 1. Parmi ces articles, huit d'entre eux sont dédiés à la détection d'acides nucléiques provenant d'agents infectieux, reflétant ainsi la demande actuelle du marché du diagnostic *in vitro*.

Tableau 1. Synthèse des essais par techniques d'hybridation pour la détection d'acides nucléiques par ICP-MS.

Année	Analyte	Marquage	Performances analytiques	Référence
2011	ARN du virus de la dengue	AuNPs	LOD : 1,6 fM Gamme linéaire : 5 fM-5 pM	84
2011	ADN	AuNPs	LOD : 1 pM	31
2011	ADN	Hg ²⁺	LOD : 8 nM Gamme linéaire : 30-600 nM	98
2013	15 ADN viraux et bactériens	Lanthanides	LOD : 0.5-2 pmol Gamme linéaire : 0.5-20 pmol	78
2014	ADN VIH, VHA, VHB	AuNPs, AgNPs, PtNPs	LOD : 1 pM Gamme linéaire : 1-100 pM	41
2014	ADN (3 séquences)	Lanthanides (Eu, Tb, Ho)	LOD : 5-11 fmol Gamme linéaire : 20 fmol-10 pmol	48
2014	miARN de <i>Arabidopsis thaliana</i>	Lanthanides (Ho, Tb, Tm)	LOD : 0.1 ng (sub-fmol)	99
2019	ARNr 16S de <i>E.coli</i> O157:H7	AuNPs	LOD : 10 fM Gamme linéaire : 10-500 fM	40
2020	ARNr 16S de bactéries intestinales	Lanthanides	LOD : 0.13-0.30 nM Gamme linéaire : 5-500 nM	100
2020	ADN de <i>Shigella flexneri</i>	AuNPs	LOD : 0.39 pM (ADN simple brin), 39.17 pM (ADN double brin) Gamme linéaire : 100-10000 pM (ADN double brin)	101

2021	miARN (3 séquences)	AuNPs, AgNPs, PtNPs	LOD : 0.18-0.23 pM Gamme linéaire : 0.25-100 pM	88
2021	ARN de SARS-CoV-2 (3 séquences)	Lanthanides NPs (Tb, Ho, Eu)	LOD : 1.2-1.3 fmol Gamme linéaire : 20-4000 fmol	91
2021	ADN de SARS-CoV-2 et H3N2	AuNPs, AgNPs	LOQ : 5-10 pM Gamme linéaire : 5/10-1000 pM	86

Hsu *et al.* ont publié en 2011 une première méthode pour détecter précocement l'ARN du virus de la dengue.⁸⁴ Des billes magnétiques fonctionnalisées avec des sondes de capture partiellement complémentaires à l'ARN cible ont été utilisées afin de l'isoler de l'échantillon de cellules lysées. Ensuite, des nanoparticules d'or comprenant d'autres séquences reconnaissant partiellement l'ARN cible ont été ajoutées, formant ainsi une structure « sandwich ». Enfin, après séparation magnétique, l'analyse par ICP-MS du ¹⁹⁷Au a permis de quantifier l'ARN viral avec une limite de détection de 1,6 fmol/L.

Plusieurs équipes ont également développé des approches similaires employant un autre support que les billes magnétiques. Wang *et al.* ainsi que Mao et ses collaborateurs ont par exemple opté pour l'utilisation de microplaques traitées à la streptavidine, exploitant la forte liaison entre la biotine et la streptavidine¹⁰² pour immobiliser des sondes de capture.^{88,101}

Plusieurs stratégies ont été mises au point par l'équipe de Zhang, dont certaines permettant une analyse multiplexée pouvant aller jusqu'à 15 acides nucléiques viraux et bactériens. Cela a été rendu possible par l'utilisation de plusieurs types de nanoparticules ou de chélates formés avec plusieurs atomes de la classe des lanthanides.^{41,78,100} Le principe de ces stratégies sont présentées dans la Figure 10 ci-dessous.

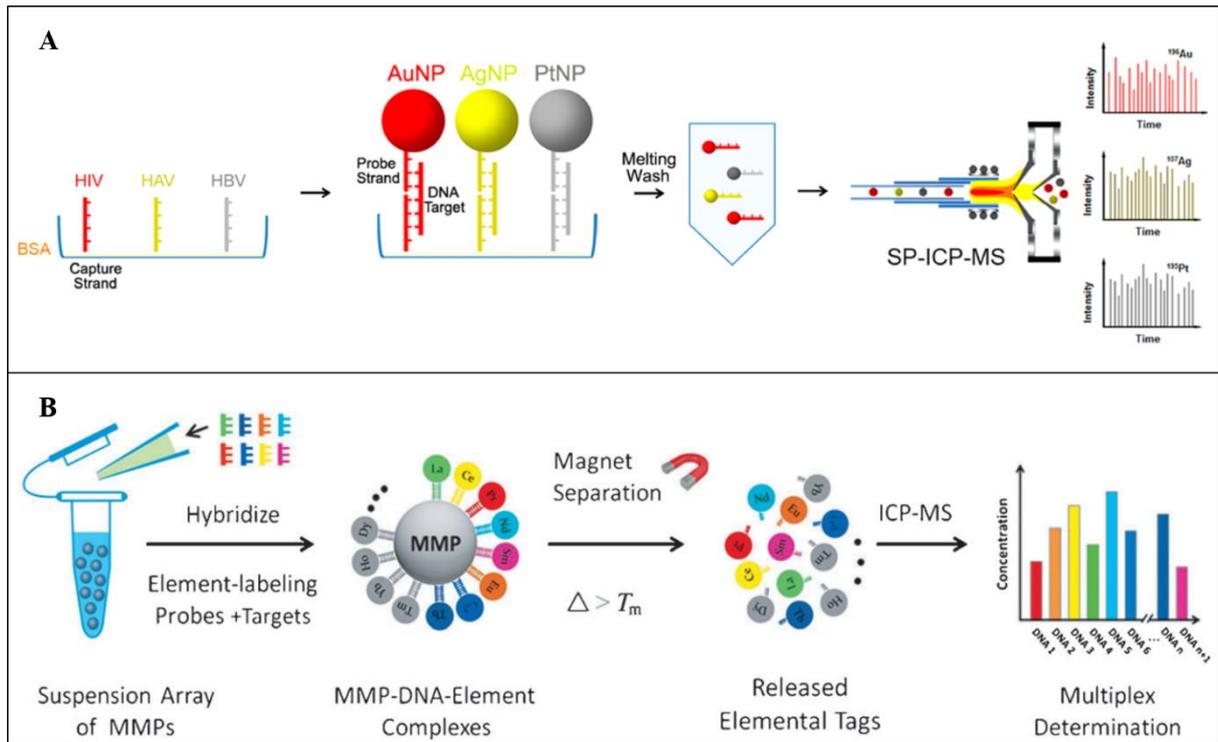


Figure 10. Illustrations de deux stratégies multiplexées développées par l'équipe de Zhang: utilisation de nanoparticules métalliques⁴¹ (A) ou de chélates de lanthanides⁷⁸ (B). Figures reprises avec la permission des éditeurs.

Depuis 2019, le monde entier a été confronté à la pandémie de coronavirus. Un certain nombre d'approches diagnostiques ont été développées, et les méthodes utilisant l'ICP-MS ne font pas exception. En 2021, Lv et ses collaborateurs ont présenté une méthode de détection multiplexée ciblant trois séquences ARN du virus SARS-CoV-2.⁹¹ Cette méthode repose sur la formation d'une structure « sandwich » entre trois sondes de capture différentes fixées sur des billes magnétiques et trois autres sondes marquées avec des nanoparticules de lanthanides. La même année, une stratégie d'analyse en phase homogène pour détecter simultanément l'ADN de SARS-CoV-2 et de la grippe A (H3N2) a été mise au point par l'équipe de Hu. Cette stratégie n'exige pas d'étape de séparation et utilise la spICP-MS pour quantifier les ADN cibles

hybridés à des oligonucléotides de capture immobilisés sur des nanoparticules d'or et d'argent.⁸⁶

La possibilité de coupler l'ICP-MS avec des techniques de séparation ou d'introduction alternative d'échantillons constitue une caractéristique intéressante et a été exploitée par certaines équipes. La détection de trois séquences d'ADN en solution et de trois séquences de miARN sur des membranes de Northern Blot à l'aide de la SEC-ICP-MS et de la LA-ICP-MS respectivement, a été réalisée à l'aide de sondes marquées par des lanthanides. D'une part, la SEC-ICP-MS a permis un suivi direct du processus d'hybridation en raison des différents temps de rétention observés pour la sonde seule et pour les produits d'hybridation.⁴⁸ D'autre part, en utilisant la LA-ICP-MS, les chercheurs ont pu analyser des membranes sèches contenant des complexes formés par la sonde de détection et la séquence cible. Les deux études ont rapporté des limites de détection de l'ordre du fmol.⁹⁹ Une autre stratégie de signalisation a également été mise au point par Li *et al.*, qui ont exploité la propriété des ions mercure (Hg^{2+}) à se lier aux thymines avec une forte affinité pour développer un essai compétitif pour la détection d'une séquence d'ADN spécifique.⁹⁸ Une sonde ayant une structure « hairpin » est incubée avec des ions Hg^{2+} . En présence de l'ADN cible, la sonde est déstructurée et l'équilibre est déplacé vers l'hybridation des deux séquences, entraînant la libération d'ions Hg^{2+} dans le milieu. La CE-ICP-MS a été utilisée pour séparer et détecter les ions Hg^{2+} libres et les adduits Hg-ADN. Le changement d'intensité du pic des ions Hg^{2+} libres permet ainsi de quantifier l'ADN cible, comme illustré dans la Figure 11.

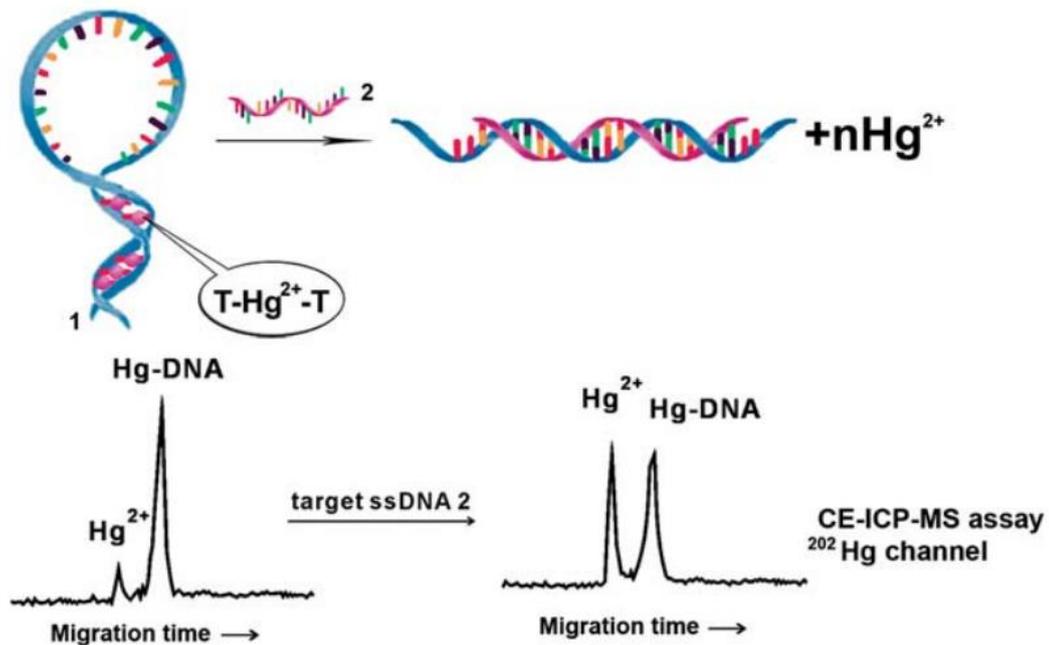


Figure 11. Illustration de la stratégie développée par Li *et al.*,⁹⁸ utilisant le mercure (Hg) en tant que révélateur du signal. Figure reprise avec la permission de l'éditeur.

2.3.2. Essais avec amplification d'acides nucléiques

Bien qu'il soit possible d'atteindre une sensibilité élevée avec des limites de détection de l'ordre du picomolaire (10^{-12} mol.L⁻¹) et femtomolaire (10^{-15} mol.L⁻¹) grâce à l'utilisation de nanoparticules ou de chélates, diverses approches d'amplification d'acides nucléiques ont été introduites afin d'améliorer davantage les performances analytiques de ces essais, permettant ainsi des quantifications pouvant parfois atteindre l'attomolaire (10^{-18} mol.L⁻¹).

Parmi les stratégies proposées, certaines sont basées sur l'utilisation d'enzymes diverses et variées :

- des polymérases servant à l'élongation d'acides nucléiques, retrouvées dans les techniques d'amplification de type « Rolling circle » (RCA) ou d'amplification isotherme médiée par les

boucles (LAMP), et parfois employées dans des techniques de déplacement de brin telles que l'« entropy-driven circuit » (EDC) ou la SDA,

- des ligases, utilisées dans les techniques d'amplification médiée par ligature (LMA),
- des nucléases, retrouvées dans des méthodes basées sur la création de « DNA walking machine », sur l'utilisation de « duplex-specific nuclease » (DSN) ou encore du système CRISPR-Cas,
- des enzymes particulières telles que les « multicomponent nucleic acid enzymes » (MNAzymes), qui sont constituées de deux parties capables de s'assembler lors de la reconnaissance d'un acide nucléique cible pour former une entité pouvant cliver plusieurs brins de substrat.¹⁰³

D'autres stratégies présentent quant à elles l'avantage de ne pas utiliser d'enzymes pour réaliser l'amplification. C'est le cas des techniques de réaction d'hybridation en chaîne (HCR) ou d'amplification par assemblage catalytique d'« hairpins » (CHA). Il est intéressant de noter que ce sont également des techniques isothermes, c'est-à-dire ne nécessitant pas de variation de température.

Dans cette partie, nous développerons seulement les approches les plus couramment proposées, à savoir l'HCR et la RCA. Les autres sont résumées dans le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2. Synthèse des essais par techniques d'hybridation avec amplification pour la détection d'acides nucléiques par ICP-MS.

<i>Année</i>	<i>Analyte</i>	<i>Marquage</i>	<i>Amplification</i>	<i>Performances analytiques</i>	<i>Référence</i>
2013	ADN VIH, VHA, VHB	Lanthanides (Eu, Tb, Ho)	RCA	LOD: 28 amol (VIH), 48 amol (VHA), 90 zmol (VHB par RCA) Gamme linéaire : 10 pM-100 nM, 250 fM-1 nM (VHB par RCA)	77
2013	ADN de <i>Listeria monocytogenes</i>	Lanthanide (Tb)	LMA : LDR et LCR	LOD : 0.4 fmol (LDR), 2.6 amol (LCR)	79
2014	ADN	AuNPs	RCA	LOD : 0.1 fM Gamme linéaire : 1-20 fM	104
2015	ADN	Lanthanide (Tb)	HCR	LOD : 300 fM Gamme linéaire : 1 pM-1 nM	105
2015	ADN VHB	AuNPs	RCA	LOD : 32 aM Gamme linéaire : 0.1-7.5 fM	106
2016	miARN (3 séquences)	Lanthanides (Pr, Tb, Tm)	DSN	LOD : 58 fmol (miR-141), 47.34 fmol (let-7d), 58.69 fmol (miR-21) Gamme linéaire : 0-200 fmol (miR-141)	107
2017	ADN	CuNPs	HCR	LOD : 4 pM Gamme linéaire : 20-1000 pM	89
2018	miARN-21	Lanthanide UCNPs (Y)	HCR	LOD : 41 aM Gamme linéaire : 0.1-500 fM	92
2018	ADN VIH	AuNPs	HCR	LOD : 0.56 amol Gamme linéaire : 10 amol-1 pmol	108
2019	ADN	AuNPs	SDA	LOD : 8.9 fM LOQ : 200 fM Gamme linéaire : 0.1-10000 pM	109
2019	ADN	AuNPs	Walking machine	LOD : 8 fM Gamme linéaire : 0.05-0.7 pM	110
2020	ADN	AuNPs	HCR	LOD : 3 fM Gamme linéaire : 5 fM-10 pM	111
2020	Gène p53	AgNCs	Walking machine	LOD : 119 aM Gamme linéaire : 0.5-500 fM	112
2020	miARN (3 séquences)	Lanthanides (Tb, Ho, Lu)	MNAzyme	LOD : 11-20 pM Gamme linéaire : 50-1000/2000 pM	113
2021	ADN Malaria miARN-10b	AuNPs	MNAzyme	LOD: - Gamme linéaire : 0.1-25 pM	114
2021	miARN Let-7a	AuNPs, AgNPs, PdNPs	HCR	LOD : 0.5 fM LOQ : 10 fM Gamme linéaire : 10 fM-5 nM	90
2021	ADN VHB	[Ru(bpy) ₂ dppz] ²⁺	Hyperbranched RCA	LOD : 1 aM Gamme linéaire : 3.5-200 aM	115
2021	miARN-21	Lanthanide (Tb)	EDC Walking Machine	LOD : 5 pM Gamme linéaire : 0.02-1 nM	116
2021	miARN-155	AuNPs	MNAzyme	LOD : 1.15 pM Gamme linéaire : 5-2000 pM	117
2022	miARN-141	Lanthanide (Tm)	CHA	LOD : 88 fmol Gamme linéaire : 0.1-2 pmol	118

2022	miARN-155 urinaire	AuNPs	DSN	LOD : 0.47 fM Gamme linéaire : 1 fM-10 pM	119
2022	miARN-21, miARN-141, miARN-125b	Lanthanides (Tb, Ho, Tm)	Walking machine	LOD : 2.3-6.3 fmol Gamme linéaire : 10-300 fmol	120
2022	ADN VHB	[Ru(bpy) ₂ dppz] ²⁺	LAMP	LOQ : 25 copies/μL Gamme linéaire : 25-10000 copies/μL	121
2022	ADN VHB	AuNPs	RCA	LOD : 5.1 fM Gamme linéaire : 10-2000 fM	122
2022	miARN-21, miARN-155, miARN-10b	Lanthanides (Tb, Ho, Lu)	EDC	LOD : 7.4-11 pM Gamme linéaire : 0.02-1 nM	123
2023	miARN-155	Lanthanide (Ho)	EDC	LOD : 8.4 pM Gamme linéaire : 0.02-1 nM	124
2023	ADN VPH-16, VPH-18, VPH-52	AuNPs AgNPs PtNPs	CRISPR-Cas12a	LOD : 218 fM (VPH-16), 491 fM (VPH-18), 268 fM (VPH-52) Gamme linéaire : 0.1-50 pM	125

2.3.2.1. Amplification par réaction d'hybridation en chaîne (HCR)

En 2015, Jiang et son équipe ont rapporté pour la première fois un essai à ADN utilisant la technique d'amplification par réaction d'hybridation en chaîne (HCR).¹⁰⁵ Il s'agit d'un procédé isotherme et sans enzyme qui requiert une séquence d'initiation pour amorcer une série d'évènements d'hybridation menant à la polymérisation de deux sondes hairpins (H1 et H2) et à la formation d'une double hélice.¹²⁶ Dans cette étude, une structure « sandwich » est formée par l'ADN cible et deux sondes de capture. La séquence d'initiation insérée dans la deuxième sonde permet de déclencher l'HCR. Chaque sonde est marquée par un ion lanthanide, ce qui entraîne la présence de centaines voire de milliers d'éléments dans la double hélice finale, amplifiant considérablement le signal mesuré en ICP-MS (Figure 12). Quelques années plus tard, la même équipe a proposé une autre conception offrant des performances améliorées avec une limite de détection 100 fois plus faible.¹¹¹ Dans cette approche, l'ADN cible a été utilisé comme déclencheur de l'HCR, tandis que des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des sondes partiellement complémentaires à la première sonde hairpin ont permis la révélation du signal. Cela a entraîné la formation d'un agrégat composé de centaines d'AuNPs, qui a pu être détecté par spICP-MS. Une approche similaire avait été développée en 2018 par Lv et ses collaborateurs, qui ont employé des sondes hairpins biotinylées capables de se conjuguer avec

des AuNPs traitées à la streptavidine, permettant ainsi la détection d'ADN du VIH-1 avec une LOD de 0,56 amol.¹⁰⁸ Ce même groupe avait également mis au point une méthode dans laquelle l'ADN double brin formé par HCR servait de modèle pour la formation *in situ* de CuNPs.⁸⁹

L'équipe de Wang a utilisé des UCNPs de lanthanide sur lesquelles sont fixées les sondes hairpins H1. La séquence cible a initié l'HCR, entraînant l'incorporation et l'accumulation d'UCNPs dans le produit de réaction généré. Avec une limite de détection de 41 amol/L, cette approche a démontré une sensibilité relativement élevée pour la détection du miARN-21.⁹²

Enfin, une méthode d'analyse multiplexée a été présentée par Zhu *et al.* en 2021 dans laquelle trois paires de sondes ADN ont été conçues pour reconnaître spécifiquement chaque miARN cible et interagir ensuite avec des sondes hairpins dans une réaction en chaîne. Au cours du processus d'HCR, des oligonucléotides marqués avec des nanoparticules élémentaires (AuNPs, AgNPs et PdNPs) ont été incorporés avec des probabilités variables, conduisant à des profils spectraux spécifique pour chaque miARN cible détecté.⁹⁰

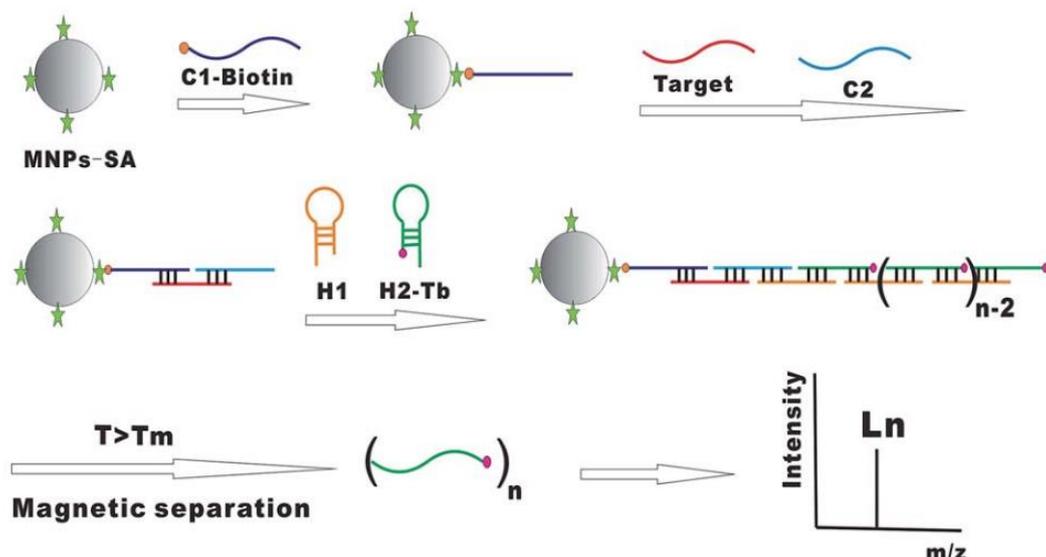


Figure 12. Illustration de la stratégie développée par l'équipe de Jiang,¹⁰⁵ utilisant une amplification par HCR. Figure reprise avec la permission de l'éditeur.

2.3.2.2. Amplification de type « rolling circle » (RCA)

L'amplification de type « rolling circle » (RCA) est un processus enzymatique isotherme qui utilise une matrice d'ADN circulaire, des polymérases et des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTPs) pour amplifier une courte amorce, conduisant ainsi à la production d'un long brin d'ADN ou d'ARN.¹²⁷ En 2013, Luo *et al.* ont mis au point une méthode dans laquelle des sondes de capture sont immobilisées sur des billes magnétiques.⁷⁷ L'ADN cible forme une structure « sandwich » entre la sonde de capture et un autre oligonucléotide appelé « bridge DNA », ce dernier contenant également une séquence d'amorce complémentaire à un ADN circulaire modèle. En présence d'une ADN polymérase et de dNTPs, la RCA est réalisée, produisant un long brin d'ADN contenant des répétitions de produits de réaction, qui sont ensuite détectées par des sondes marquées avec un ion lanthanide. Cette approche a permis une détection de l'ADN du virus de l'hépatite B (VHB) avec une sensibilité multipliée par 190 par rapport à une méthode sans RCA, atteignant une limite de détection de 90 zmol. Fu et ses collaborateurs ont rapporté un essai utilisant directement la cible en tant que matrice d'ADN circulaire et des oligonucléotides marqués avec des AuNPs pour la révélation du signal.¹⁰⁴

Une stratégie en phase homogène a récemment été développée par l'équipe de Hu, effectuant la RCA directement sur un motif particulier d'ADN circulaire appelé « DNA padlock ».¹²² L'amplification directe de l'ADN cible a été suivie par l'hybridation d'AuNPs fonctionnalisées avec des sondes complémentaires. Pour permettre l'analyse ultérieure par spICP-MS, le brin d'ADN généré a été condensé par l'ajout de spermidine dans le milieu, favorisant ainsi l'agglomération des AuNPs. Le principe est illustré dans la Figure 13.

En utilisant les produits de RCA comme modèle pour une amplification exponentielle et par l'emploi de deux amorces, il est possible de générer de l'ADN double brin.¹²⁷ Ce processus est appelé « hyperbranched RCA » et a été exploité par l'équipe de Hu dans le cadre

de la détection d'ADN du VHB. Ils ont pour cela utilisé un complexe à base de ruthénium (Ru) appelé $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$, qui est capable de s'intercaler dans l'ADN double brin et d'activer sa fluorescence en raison de l'environnement hydrophobe. Le ruthénium est également un élément pertinent en raison de sa rareté dans les matrices biologiques, ce qui facilite sa détection par ICP-MS. Une limite de détection de 1 amol/L a ainsi été atteinte, faisant de cette approche l'une des plus sensibles pour l'analyse d'ADN par ICP-MS.

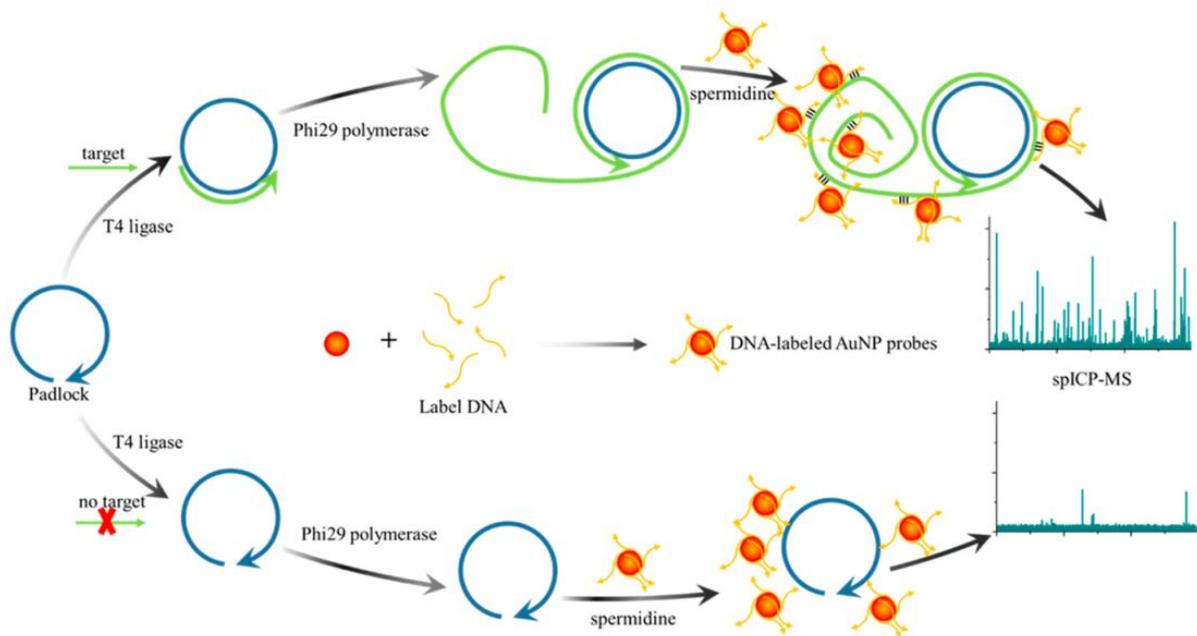


Figure 13. Illustration de la stratégie développée par l'équipe de Hu,¹²² utilisant une amplification par RCA. Figure reprise avec la permission de l'éditeur.

2.4. Détection d'autres cibles à l'aide des aptamères

2.4.1. Généralités

Les aptamères sont des oligonucléotides synthétiques monocaténares qui présentent une affinité et une spécificité de liaison élevées vis-à-vis d'une cible donnée.¹²⁸ Ils sont sélectionnés par une procédure *in vitro* appelée SELEX, mise au point en 1990 par Tuerk et Gold,¹²⁹ et dont le fonctionnement est représenté dans la Figure 14. La première étape consiste à incuber une banque d'oligonucléotides contenant un grand nombre de séquences aléatoires (généralement de l'ordre de 10^{14} à 10^{15}) avec une cible d'intérêt dans des conditions opératoires préalablement définies. Grâce à la diversité conséquente de cette banque, seule une petite partie des séquences sont capables de reconnaître naturellement la cible avec une affinité plus ou moins importante. Les séquences affines, en vue de leur amplification par PCR, sont séparées des séquences qui ne se lient pas à la cible principalement par des méthodes chromatographiques telles que la chromatographie d'affinité sur gel d'agarose, la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), ou à l'aide de billes magnétiques sur lesquelles la cible aura été préalablement immobilisée. Les candidats aptamères amplifiés sont ensuite soumis à un nouveau cycle SELEX, réalisé dans des conditions plus stringentes. Entre 10 et 15 cycles sont généralement nécessaires pour obtenir des séquences ayant une affinité satisfaisante pour la cible d'intérêt. Au terme du dernier cycle, les séquences les plus affines sont caractérisées par séquençage.^{130,131}

Les aptamères isolés contiennent généralement 70 à 80 nucléotides et peuvent être tronqués pour ne conserver que la région responsable de l'interaction avec la cible, ou pour faciliter leur repliement en une structure favorisant cette interaction.¹³⁰ La longueur minimale de liaison d'un aptamère se situe généralement entre 25 à 40 nucléotides, avec un poids moléculaire d'environ 8 à 13 kDa.^{130,132}

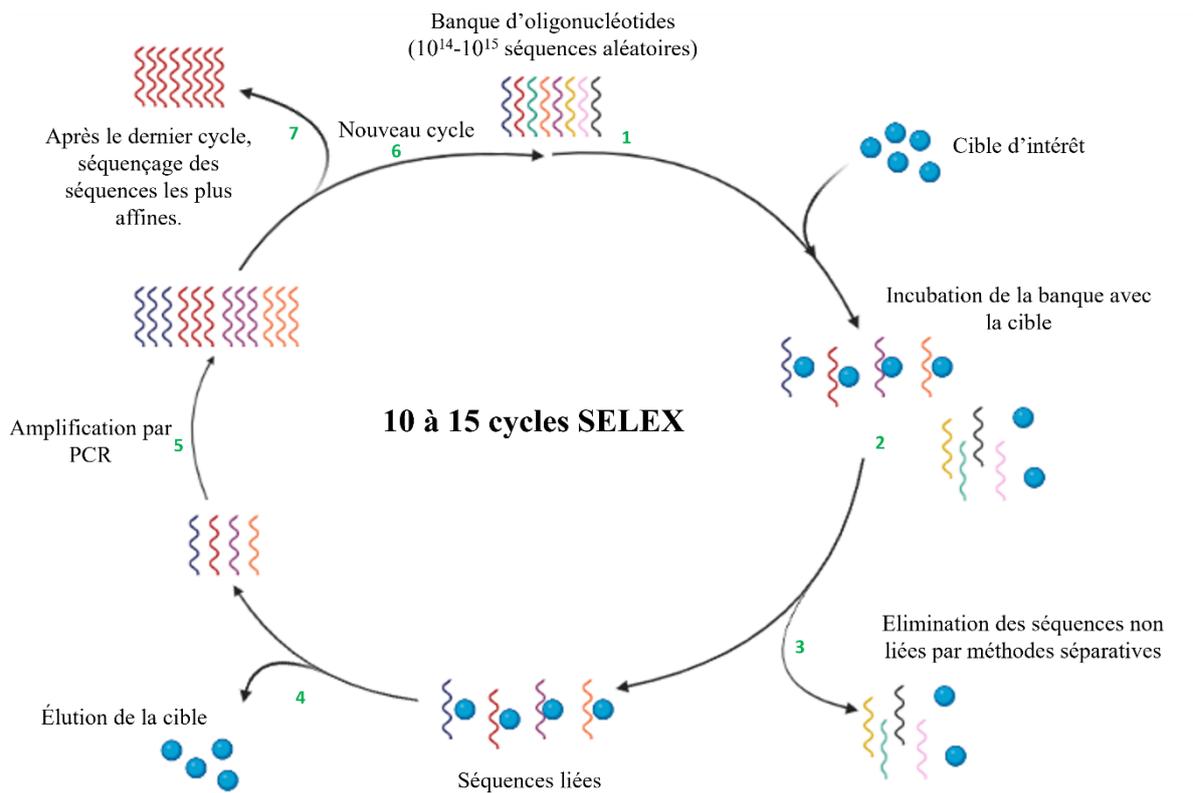


Figure 14. Les différentes étapes de la méthode SELEX.

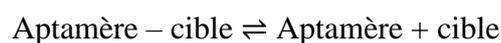
Selon la cible d'intérêt et l'application désirée, d'autres modes de SELEX peuvent être utilisés, qui diffèrent de la méthode SELEX conventionnelle par le mode de séparation des séquences affines et non affines, ou bien par le mécanisme de reconnaissance de la cible. Parmi eux, certains tels que la capture-SELEX, la CE-SELEX ou encore la « graphène oxide » (GO)-SELEX peuvent être employés pour surmonter les difficultés rencontrées lors de la sélection d'aptamères dirigés contre des petites molécules. En effet, la méthode SELEX conventionnelle nécessite généralement l'immobilisation des ligands sur une matrice solide. Or, cette méthode est peu adaptée pour les petites molécules, dont le greffage s'avère fastidieux en raison du manque de groupements fonctionnels.^{133,134} La capture-SELEX consiste à conjuguer la banque d'oligonucléotides à des billes magnétiques *via* des séquences d'ancrage situées à leurs extrémités. Un changement conformationnel se produit lors de la reconnaissance de la cible,

entraînant le déplacement des séquences affines de la surface de la matrice.¹³⁵ La GO-SELEX est une autre méthode exploitant la propriété de l'oxyde de graphène à adsorber l'ADN simple brin par le biais d'interactions π - π . De cette manière, les séquences non liées à la cible d'intérêt peuvent être facilement séparées des séquences liées par simple centrifugation.¹³⁶

La CE-SELEX quant à elle, permet de réduire le nombre de cycles (de 1 à 4, en général), améliorant ainsi la rapidité de la sélection. La séparation des complexes aptamère-cible s'effectue selon la mobilité électrophorétique sous l'action d'un champ électrique.¹³⁷ Cette technique est notamment développée au sein du Département de Pharmacochimie Moléculaire et a été employée pour la sélection d'aptamères dirigés contre un peptide, la conotoxine,¹³⁸ et contre la protéine Tau.¹³⁹

Un autre mode couramment utilisé pour la sélection d'aptamères dirigés contre des cellules entières est la Cell-SELEX. Cette méthode implique l'interaction de la banque d'oligonucléotides avec de multiples biomarqueurs exposés à la surface des cellules, donnant lieu à une variété d'aptamères reconnaissant différents marqueurs membranaires sur une cellule donnée. Cette approche a permis la sélection d'aptamères dirigés contre le sperme ou contre les érythrocytes, avec des applications en science médico-légale.¹³³

À la fin du processus de SELEX, l'objectif est de choisir la ou les séquences d'aptamères présentant le meilleur profil d'affinité vis-à-vis de la cible. Celle-ci est exprimée par la constante de dissociation K_d , qui représente l'équilibre de la réaction :



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

D'après la formule ci-dessus, plus le K_d est faible, plus l'affinité d'un aptamère pour sa cible est importante. Sa détermination peut se faire par diverses méthodes de caractérisation des interactions telles que le titrage calorimétrique isotherme (ITC), l'anisotropie de fluorescence, ou la résonance plasmonique de surface (SPR).¹³³

Souvent considérés comme des « anticorps synthétiques », les aptamères présentent de nombreux avantages par rapport à ces derniers. Leur synthèse est plus facile et plus rapide avec des possibilités de modification chimique et de fonctionnalisation plus flexibles. Ils présentent également une meilleure stabilité, des propriétés de stockage plus avantageuses, et leur dénaturation est réversible. De plus, leur synthèse *in vitro* réduit les préoccupations éthiques associées à la production des anticorps. Enfin, leur coût de production est généralement plus faible que celui des anticorps traditionnellement utilisés dans le cadre d'immunodosages.^{130,140}

Le Tableau 3 résume les principales caractéristiques des aptamères en comparaison avec les anticorps conventionnels.¹⁴¹⁻¹⁴³

Tableau 3. Avantages des aptamères par rapport aux anticorps conventionnels.

	Anticorps conventionnel	Aptamère
Synthèse	<i>In vivo</i> (animal), processus biologique	<i>In vitro</i> , processus chimique
Coût de production	Élevé	Réduit
Temps de production	Long : environ 6 mois	Court : entre 2 et 8 semaines
Taille	Environ 150 kDa	Entre 13 et 26 kDa
Cibles	Immunogéniques	Tout type
Reconnaissance de la cible	En conditions physiologiques	Conditions adaptables
Variation inter-lot	Élevée	Faible
Modifications et fonctionnalisation	S'effectuent à des positions aléatoires	Peuvent être introduites à des positions définies
Stabilité	Sensible à la température Dénaturation irréversible	Thermostables Dénaturation réversible
Durée de conservation	Limitée	Longue

L'une des principales caractéristiques des aptamères réside dans leur capacité à reconnaître un large panel de cibles allant des ions métalliques aux peptides, en passant par les petites molécules, les protéines, les particules virales, les micro-organismes ainsi que les cellules humaines, les tissus ou même les organes.^{130,144} La reconnaissance de la cible par l'aptamère s'effectue par le biais de multiples points de contact impliquant des interactions électrostatiques et de « stacking », des liaisons hydrogène ainsi que des effets stériques. Une protéine est souvent reconnue en surface tandis qu'une petite molécule se loge généralement dans une cavité située au cœur de l'aptamère, qui est capable de s'ajuster à sa cible en effectuant des repliements successifs.¹⁴¹

Les applications sont nombreuses, allant du diagnostic¹⁴⁵ jusqu'à la thérapeutique¹⁴³, en passant par la détection de biomolécules dans des matrices environnementales^{146,147} ou alimentaires¹⁴⁸, le domaine de la biodéfense^{149,150} ainsi que la science médico-légale¹³³.

2.4.2. Applications en ICP-MS

Jusqu'à présent, 17 publications utilisant les aptamères comme éléments de reconnaissance dans des essais avec détection par ICP-MS sont répertoriées dans la littérature. Un résumé de ces publications est présenté dans le Tableau 4 ci-dessous. Il est intéressant de noter qu'une seule d'entre elles a utilisé des chélates de lanthanides en tant que révélateur de signal, tandis que les autres ont employé des nanoparticules élémentaires de différents types. De plus, seulement cinq approches ont utilisé une méthode d'amplification d'acides nucléiques décrites dans la partie 2.3.2.

Tableau 4. Synthèse des essais à base d'aptamères avec détection par ICP-MS.

<i>Année</i>	<i>Analyte</i>	<i>Marquage</i>	<i>Amplification</i>	<i>Performances analytiques</i>	<i>Référence</i>
2009	Thrombine	AuNPs	-	LOD : 10 pM Gamme linéaire : 0.05-5 nM	83
2011	Cytochrome c	AuNPs	-	LOD : 1.5 fmol Gamme linéaire : 0.1-20 nM	85
2014	IgM membranaires	Ag cluster	-	-	95
2015	Cellules d'hépatocarcinome SMCC-7721	AuNPs	-	LOD : 100 cellules/mL Gamme linéaire : 0-8000 cellules	151
2016	CTC HepG2	AuNPs	HCR	LOD : 15 cellules Gamme linéaire : 40-8000 cellules	152
2018	Cellules de cancer du sein MCF-7	AuNPs	-	LOD : 81 cellules Gamme linéaire : 200-12000 cellules	153
2018	Cellules SMMC-7721 et cellules de carcinome pulmonaire A549	AuNPs, AgNPs	HCR	LOQ : 50 cellules Gamme linéaire : 100-6000 cellules	87
2020	OTA FB1	CdQDs AgNPs	-	LOD : 0.10 ng/mL (OTA), 0.30 ng/mL (FB1) Gamme linéaire : 0.5-50 ng/mL (OTA), 1-100 ng/mL (FB1)	94
2020	Cellules de cancer du sein MCF-7	Lanthanide (Tb)	Endonucléase	LOD : 87 cellules Gamme linéaire : 250-10000 cellules	80
2020	ATP intracellulaire	AgNCs	-	LOD : 0.18 nM Gamme linéaire : 0.5-1000 nM	96
2020	Thrombine	AuNPs	-	LOD : 4.5 fM Gamme linéaire : 10 fM-100 pM	154
2021	Protéines exosomales (CD63, EpCAM, HER2)	Lanthanides UCNPs (Y, Eu, Tb)	-	LOD : 0.074 µg/mL Gamme linéaire : 0.5-6 µg/mL	93
2021	CTC	AuNPs	-	100% efficacité de capture 93.6% taux de séparation 73.8 ± 5.0% efficacité de mesure	155

2022	<i>S.aureus</i> <i>V.parahaemolyticus</i> <i>S.typhimurium</i>	AuNCs AgNCs CuNCs	-	LOD : 10 CFU/mL	156
2022	CEA AFP	AuNCs CuNCs	HCR	LOD : 0.6 pg/mL (CEA), 0.5 pg/mL (AFP) LOQ : 2.0 pg/mL (CEA), 1.6 pg/mL (AFP) Gamme linéaire : 0.01-100/200 ng/mL	157
2022	OTA	AuNPs	RCA	LOD : 10 fM Gamme linéaire : 0.01-2000 pM	158
2023	β -Conglutin	AuNPs	-	LOD : 2 pM Gamme linéaire : 0.001-0.08 nM	159

2.4.2.1. Détection de molécules de faible poids moléculaire

L'un des enjeux actuels dans le domaine de la bioanalyse est la détection de petites molécules, définies par un poids moléculaire inférieur à 1000 Da.¹⁶⁰ En 2020, l'équipe de Xu a élaboré une méthode d'analyse multiplexée pour la détection de l'ochratoxine A (OTA) et de la fumonisine B1 (FB1), deux mycotoxines qui peuvent contaminer les produits alimentaires et avoir des effets néfastes sur la santé humaine et animale.⁹⁴ Deux sondes de révélation ont été conçues, l'une marquée par des quantum dots de cadmium (CdQDs) et l'autre par des nanoparticules d'argent (AgNPs). Ces sondes sont capables de s'hybrider avec deux aptamères immobilisés sur des billes magnétiques et qui reconnaissent respectivement l'OTA et la FB1. Lorsque les cibles sont présentes, les sondes de révélation se déshybrident par un phénomène de compétition grâce au changement conformationnel des aptamères. L'analyse par ICP-MS du ¹¹¹Cd et du ¹⁰⁷Ag ont permis d'atteindre des limites de détection de 0,10 ng/mL pour l'OTA et de 0,30 ng/mL pour la FB1. Des expériences ont été effectuées sur des échantillons de farine de blé et ont montré des résultats favorablement comparables à l'analyse « gold standard » par HPLC-MS/MS. Cette méthode est illustrée dans la Figure 15 ci-dessous.

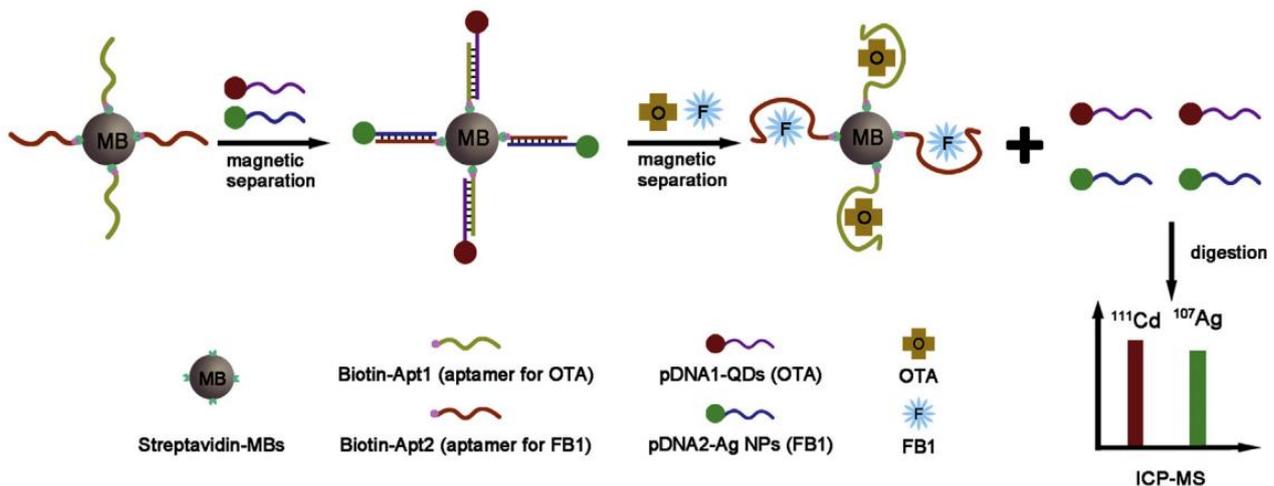


Figure 15. Illustration de la stratégie développée par l'équipe de Xu,⁹⁴ utilisant les aptamères pour la détection d'OTA et de FB1 par ICP-MS. Figure reprise avec la permission de l'éditeur.

Une approche différente pour la détection d'OTA a été récemment proposée par Chen et son équipe, qui ont utilisé une sonde hairpin comprenant une séquence aptamère et une amorce de RCA.¹⁵⁸ La présence d'OTA entraîne l'ouverture de la sonde, permettant d'initier la RCA. Plusieurs AuNPs fonctionnalisées avec des séquences d'ADN complémentaires aux produits d'amplification ont ensuite été introduites, permettant la détection d'OTA dans des échantillons de farine à des concentrations de l'ordre du fmol/L.

Une stratégie de détection multimodale d'adénosine triphosphate (ATP) intracellulaire a récemment été développée par l'équipe de Hu.⁹⁶ Des nanoclusters d'argent (AgNCs) greffés à l'aptamère anti-ATP ont été employés à la fois pour réaliser à la fois de l'imagerie par fluorescence et de la quantification par ICP-MS. L'utilisation de nanofeuilles de disulfure de molybdène (MoS₂) a permis l'atténuation de la fluorescence des AgNCs en interagissant avec les sondes aptamériques. En présence d'ATP, les sondes aptamères-AgNCs sont libérées de la surface des nanofeuilles, rétablissant la fluorescence. Le surnageant est ensuite récupéré afin de

quantifier le ^{107}Ag par ICP-MS. Les chercheurs ont également rapporté une application réussie de cette méthode dans des cellules HeLa, obtenant une limite de détection comparable à celle d'un kit commercial de détection d'ATP.

2.4.2.2. Détection de protéines

Quelques articles ont été publiés sur le développement d'essais à base d'aptamères pour la détection sensible de protéines par ICP-MS. En 2009, Zhao *et al.* ont conçu une technique « sandwich » pour la détection de l' α -thrombine, une protéine impliquée dans la coagulation sanguine, en utilisant deux aptamères qui peuvent se lier à différents sites de reconnaissance (Figure 16).⁸³ L'un des aptamères est attaché sur une bille magnétique tandis que l'autre est fixé sur des AuNPs. Après séparation magnétique, les AuNPs ont été analysées par ICP-MS, permettant l'obtention d'une limite de détection de 10 pmol/L. Une autre méthode de détection de thrombine a été mise au point par Xing *et al.*, exploitant les propriétés d'interaction de l'oxyde de graphène (GO) avec les acides nucléiques monocaténaux.¹⁵⁴ En effet, après adsorption à sa surface d'un aptamère marqué par une AuNP, l'ajout de la cible induit le changement conformationnel de l'aptamère, entraînant sa désorption. Les AuNPs libérées ont ensuite été quantifiées par spICP-MS.

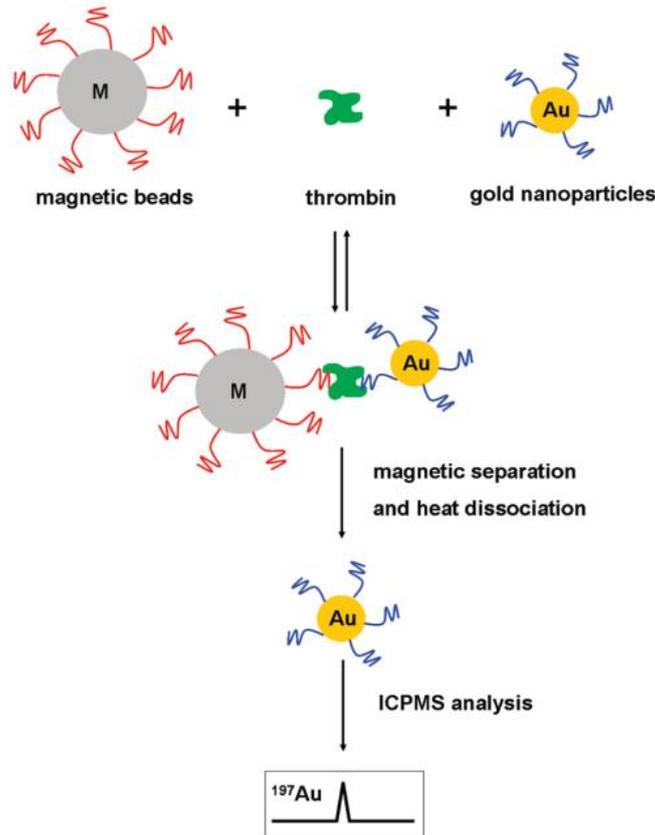


Figure 16. Illustration de la stratégie développée par Zhao *et al.*,⁸³ utilisant les aptamères pour la détection de thrombine par ICP-MS. Figure reprise avec la permission de l'éditeur.

Une approche associant immunodosage et « aptadosage » a été proposée par Liu *et al.* dans le cadre de la détection multiplexée de cytochrome c et d'insuline.⁸⁵ Les deux protéines sont capturées par des microsphères de magnétite activée (Fe_3O_4), puis reconnues respectivement par un aptamère marqué avec une AuNP et un anticorps marqué avec une AgNP. Les quantités d'or et d'argent sont ensuite mesurées par ICP-MS après séparation magnétique et collecte des complexes protéine-sonde.

Zhu *et al.* ont récemment décrit une stratégie pour l'analyse simultanée de deux biomarqueurs de cancers, l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) et l' α -foetoprotéine (AFP).¹⁵⁷ En combinant une amplification par HCR et la formation de nanoclusters métalliques, une

détection ultrasensible ainsi qu'un faible bruit de fond ont pu être obtenus. Deux duplex aptamère-ADN complémentaire ont été immobilisés sur une surface solide par une interaction biotine-streptavidine. En présence de CEA et d'AFP, les duplex se dissocient pour favoriser la liaison entre les aptamères et leur cible respective. Une exonucléase est ensuite ajoutée afin de digérer les aptamères, permettant le recyclage des analytes cibles pour des cycles répétés de reconnaissance-digestion. Après cette étape d'amplification initiale, la HCR est réalisée en utilisant deux paires de sondes hairpins partiellement complémentaires aux séquences d'ADN restées immobilisées. Les produits d'HCR ainsi générés ont servi de modèle pour la formation de nanoclusters d'or et de cuivre, analysés ensuite par spICP-MS.

Dans le domaine de la sécurité alimentaire, Torregrosa *et al.* ont développé une méthode compétitive pour la détection de β -conglutine, une protéine allergène retrouvée dans la farine de lupin.¹⁵⁹ Deux stratégies de greffage de l'aptamère sur des AuNPs ont été explorées, l'une utilisant un aptamère thiolé, l'autre un aptamère biotinylé. L'équipe a également étudié deux modes d'ICP-MS différents : la méthode conventionnelle ainsi que la spICP-MS. En conditions optimales, cette méthode a permis d'atteindre une limite de détection de 2 pmol/L et a montré une bonne applicabilité dans des échantillons de farine.

2.4.2.3. Détection de systèmes complexes

Comme mentionné précédemment, les aptamères sont capables de reconnaître des substances de taille plus importante telles que des organelles, des cellules ou des micro-organismes. Dans un contexte où l'oncologie et l'infectiologie sont des domaines en plein essor, certaines équipes ont fait état de travaux visant à répondre aux besoins actuels. L'équipe de Wang s'est intéressée aux exosomes, des organelles potentiellement utiles comme biomarqueurs non invasifs pour le diagnostic et le pronostic de cancer.⁹³ Ils ont sélectionné trois aptamères ciblant les protéines CD63, EpCAM et HER2 exprimées à la surface des exosomes,

qu'ils ont hybridés avec des sondes ADN attachées sur des nanoparticules d'or et marquées avec des UCNPs de lanthanide. La présence d'exosomes induit la liaison des aptamères à leurs cibles correspondantes, entraînant la libération des sondes ADN-UCNPs utilisées comme révélatrices du signal. Cette stratégie a permis de différencier avec précision les exosomes provenant de sept lignées cellulaires différentes en peu de temps. Des expériences sur des échantillons cliniques ont été menées et ont montré des résultats prometteurs qui pourraient contribuer au dépistage précoce du cancer de l'estomac. La même équipe a également conçu une puce microfluidique couplée à l'ICP-MS pour la capture des cellules tumorales circulantes (CTCs).¹⁵⁵ Ils ont utilisé des AuNPs fonctionnalisées avec des aptamères qui se lient sélectivement aux protéines PTK7 et EpCAM exprimées à la surface des CTCs. Cette plateforme a atteint une efficacité de capture de 100%, un taux de séparation de 93,6% et une capacité à mesurer une seule CTC avec une efficacité de $73.8 \pm 5.0\%$ dans des prélèvements sanguins.

Gao et ses collaborateurs ont développé une approche permettant l'analyse spatiale et quantitative des immunoglobulines M (IgM) membranaires situées à la surface des cellules du lymphome de Burkitt.⁹⁵ L'emploi d'un aptamère contenant un cluster d'argent a permis d'effectuer de l'imagerie par fluorescence ainsi qu'une quantification par ICP-MS. Cependant, les performances analytiques de cette méthode ainsi que d'éventuelles expérimentations sur des échantillons biologiques n'ont pas été décrites par les chercheurs.

Une méthode de quantification spécifique de cellules d'hépatocarcinome SMMC-7721 a été décrite par Fu et ses collaborateurs et est illustrée dans la Figure 17.¹⁵¹ Des sondes de captures présentes à la surface d'AuNPs sont capables de s'hybrider avec un aptamère fixé sur une bille magnétique. Une amplification de ce signal a été rendue possible par le greffage de sondes auxiliaires à la surface des AuNPs, permettant le marquage d'autres AuNPs citratées via leurs fonctions thiol. En présence de cellules cibles, les AuNPs sont libérées et collectées. Leur

analyse par ICP-MS a permis de calculer une limite de détection de 100 cellules/mL. Les expériences menées sur une population cellulaire et dans des échantillons de sérum dopés ont montré une forte résistance aux matrices complexes ainsi qu'une applicabilité prometteuse pour le diagnostic clinique.

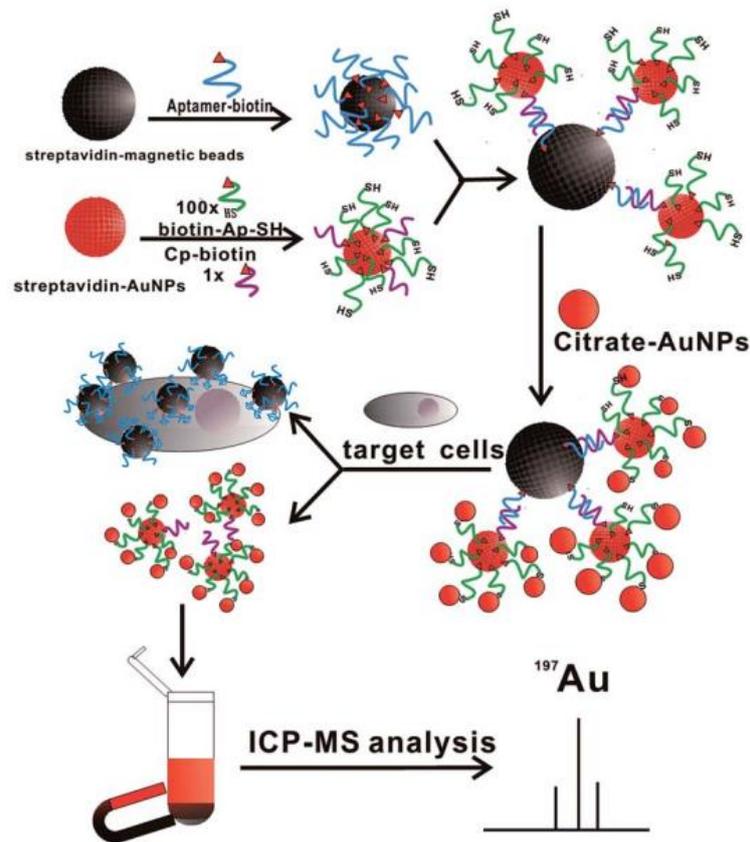


Figure 17. Illustration de la stratégie développée par l'équipe de Fu,¹⁵¹ utilisant les aptamères pour la détection de cellules tumorales par ICP-MS. Figure reprise avec la permission de l'éditeur.

La même équipe a ensuite proposé une stratégie d'analyse multiplexée impliquant une amplification par HCR pour la détection simultanée de cellules SMMC-7221 et de cellules de carcinome pulmonaire A549.⁸⁷ L'HCR est initiée sur des aptamères immobilisés sur une bille magnétique, formant ainsi de longs multimères d'ADN capables de capturer des AuNPs et des

AgNPs. La liaison des aptamères à leurs cibles respectives a conduit à la libération des multimères marqués par de nombreuses nanoparticules élémentaires qui sont ensuite collectées et analysées par ICP-MS.

L'HCR a également été utilisée précédemment par l'équipe de Hu pour la détection de CTCs HepG2.¹⁵² Dans un premier temps, des anticorps dirigés contre EpCAM ont été fixés à la surface de billes magnétique pour capturer les cellules tumorales exprimant cette protéine. Après une isolation par séparation magnétique, l'aptamère TLS11a spécifique des cellules HepG2 ainsi que deux sondes hairpins ont été introduites pour initier le processus d'amplification. Le multimère d'ADN généré a permis le marquage de multiples AuNPs *via* une interaction biotine-streptavidine. Par rapport à une méthode sans HCR, la sensibilité a été améliorée avec une limite de détection 15 fois plus faible (15 cellules *versus* 224 cellules). L'utilisation de l'aptamère spécifique TLS11a a également assuré la spécificité de l'essai, permettant la reconnaissance des cellules HepG2 uniquement parmi d'autres cellules cancéreuses.

Une autre approche basée sur l'utilisation d'AuNPs en tant qu'inhibiteurs de fluorescence et révélateurs du signal a été développée par la même équipe.¹⁵³ Cette méthode utilise un aptamère ciblant la protéine MUC-1, qui est surexprimée par les cellules MCF-7 dans le cancer du sein. L'aptamère est conjugué à un fluorophore, tandis qu'une sonde ADN complémentaire à l'aptamère et marquée avec des AuNPs est employée afin de désactiver la fluorescence du fluorophore. La présence de cellules MCF-7 entraîne le déplacement de cette sonde, induisant une récupération de la fluorescence et permettant une imagerie cellulaire. Le surnageant contenant les AuNPs est ensuite recueilli pour une quantification par ICP-MS.

L'équipe a ensuite proposé une nouvelle plateforme qui a la particularité d'être non destructive.⁸⁰ Une sonde de capture composée d'un aptamère et d'un brin « initiateur » a été conçue pour se lier spécifiquement aux cellules MCF-7. Lors de la reconnaissance de la cible

par l'aptamère, le brin initiateur est libéré puis incubé avec une sonde de détection marquée avec un lanthanide. Le duplex ainsi formé est ensuite clivé par une endonucléase, libérant de nombreux fragments marqués. La dissociation du brin initiateur permet sa réutilisation pour d'autres cycles. D'autre part, une digestion par nucléase a été appliquée pour collecter les cellules capturées en vue d'une autre culture *a posteriori*. Cette méthode a montré une viabilité cellulaire de 74,3% après cette deuxième culture.

Yao *et al.* ont récemment développé une méthode de détection multiplexée pour identifier trois espèces de bactéries pathogènes d'origine alimentaire, notamment *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Salmonella typhimurium*.¹⁵⁶ Des nanoparticules magnétiques recouvertes de peptides spécifiques ont été utilisées pour isoler et concentrer les bactéries cibles. Trois aptamères ciblant chacun un pathogène différent ont été marqués avec des nanoclusters métalliques. Après séparation magnétique, le surnageant contenant les aptamères non liés est récupéré et analysé par ICP-MS. Ainsi, la relation entre l'intensité du signal des marqueurs élémentaires et la concentration des micro-organismes est inversement proportionnelle. Cette méthode a permis une détection simultanée des trois bactéries en seulement 30 minutes, avec une limite de détection de 10 UFC/mL, et son application en échantillon réel a été démontrée avec succès, offrant des perspectives encourageantes pour la conception de dispositifs « point-of-care ».

Deuxième partie : Partie expérimentale

1. Introduction

1.1. Contexte

Jusqu'à présent, les méthodes de quantification de biomolécules par ICP-MS à base d'aptamères ayant été développées ont privilégié l'utilisation de nanoparticules élémentaires ou de chélates de lanthanides en tant que stratégie de marquage. Comme évoqué précédemment, les nanoparticules métalliques possèdent des capacités élevées d'amplification du signal, tandis que les chélates de lanthanides sont intéressants pour la réalisation d'analyses multiplexées avec un faible bruit de fond. Néanmoins, ces approches présentent quelques limites. D'une part, le caractère hétérogène des nanoparticules élémentaires, le manque de reproductibilité d'un lot à un autre ainsi que leur dégradation au fil du temps et des manipulations peuvent être à l'origine de difficultés expérimentales et conduire à des données incohérentes.^{161,162} De plus, ces dernières doivent être purifiées et caractérisées, et les conditions de synthèse ainsi que le processus d'immobilisation d'aptamères à leur surface doit être soigneusement contrôlé, compliquant ainsi leur utilisation.^{97,163} D'autre part, le marquage par des chélates de lanthanides peut se révéler complexe, nécessitant non seulement la conjugaison de l'agent chélateur à l'aptamère, mais aussi la complexation de l'ion métallique. Cette étape doit être effectuée de façon indépendante en raison de leur capacité à se lier aux bases nucléiques de manière plus ou moins affine.^{80,164}

1.2. Stratégie innovante de marquage

Il serait donc souhaitable d'élaborer des stratégies alternatives de marquage qui pourraient répondre aux inconvénients cités ci-dessus. Notre intérêt s'est donc porté vers l'utilisation d'un marqueur organique non métallique, la L-thyroxine. Il s'agit de la forme synthétique de la thyroxine, une hormone sécrétée par la glande thyroïde, et est notamment indiquée dans le traitement de certains troubles thyroïdiens. Cet acide aminé présente certaines caractéristiques rendant possible son utilisation en tant que marqueur :

- elle contient quatre atomes d'iode (Figure 18), élément utilisé dans de précédents travaux pour la conception d'immunoessais¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ ou la dérivation de protéines ou de peptides, permettant la quantification directe de la cible d'intérêt,¹⁶⁸⁻¹⁷⁰
- elle est commercialement disponible à un haut niveau de pureté (généralement supérieur à 98%) et à moindre coût (environ 0,07€ par mg),¹⁷¹
- la présence de groupements réactifs permet une conjugaison aisée avec des biomolécules telles que la BSA,¹⁷²
- la synthèse d'oligonucléotides marqués par une molécule de L-thyroxine est commercialement proposée sur demande,
- sa petite taille (777 g/mol, soit 7,77 kDa) devrait minimiser l'impact sur la conformation active de l'aptamère et sur la liaison effective à sa cible.

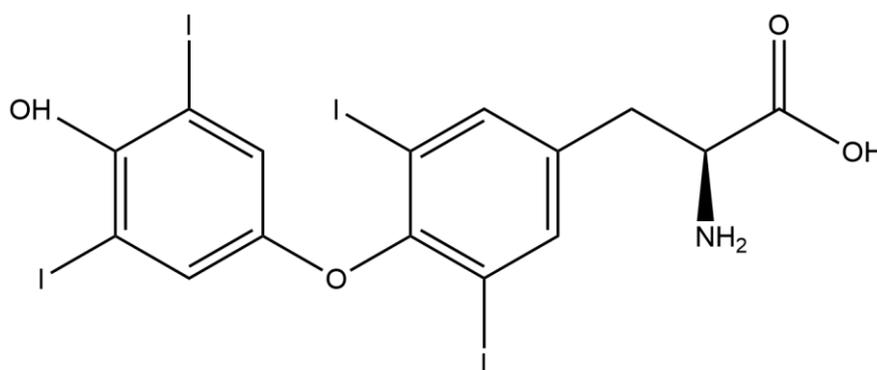


Figure 18. Structure de la L-thyroxine.

1.3. Concept du projet

Afin de démontrer la faisabilité de notre projet, nous nous sommes focalisés sur la détection d'un analyte modèle, la L-tyrosinamide (L-Tym), dont la structure est représentée dans la Figure 19. En raison de la petite taille de cette cible (180,2 g/mol), une approche compétitive basée sur le changement de conformation de l'aptamère a été mise au point, similaire à une méthode précédemment décrite par l'équipe de Zhao pour un essai optique en phase hétérogène.¹⁷³

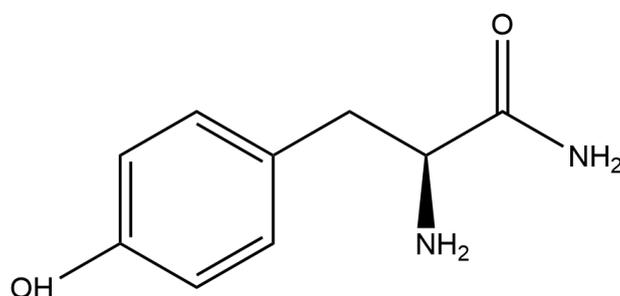


Figure 19. Structure de la L-tyrosinamide.

Le processus est illustré dans la Figure 20. Une séquence d'ADN biotinylée et partiellement complémentaire (ADNc) à l'aptamère dirigé contre la L-tyrosinamide a été immobilisée à la surface d'une microplaque recouverte de streptavidine. L'échantillon biologique, contenant également l'aptamère marqué par une molécule de L-thyroxine, a ensuite été ajouté dans les puits. En l'absence de cible, l'aptamère s'hybride avec l'ADNc immobilisé. L'ajout d'acide nitrique (HNO_3) permet de dissocier les complexes aptamère-ADNc, et les éléments iodés libérés sont quantifiés par ICP-MS. En présence de cible, une compétition se produit entre celle-ci et l'ADNc pour la liaison à l'aptamère, ce qui entraîne la libération des complexes aptamère-cible en solution. Ces derniers sont ensuite éliminés lors de l'étape de lavage.

Ainsi, plus la concentration de la cible est élevée, plus la quantité de complexes aptamère-ADNc présents à la surface des puits est faible, conduisant à une diminution du signal en iode mesuré par ICP-MS.

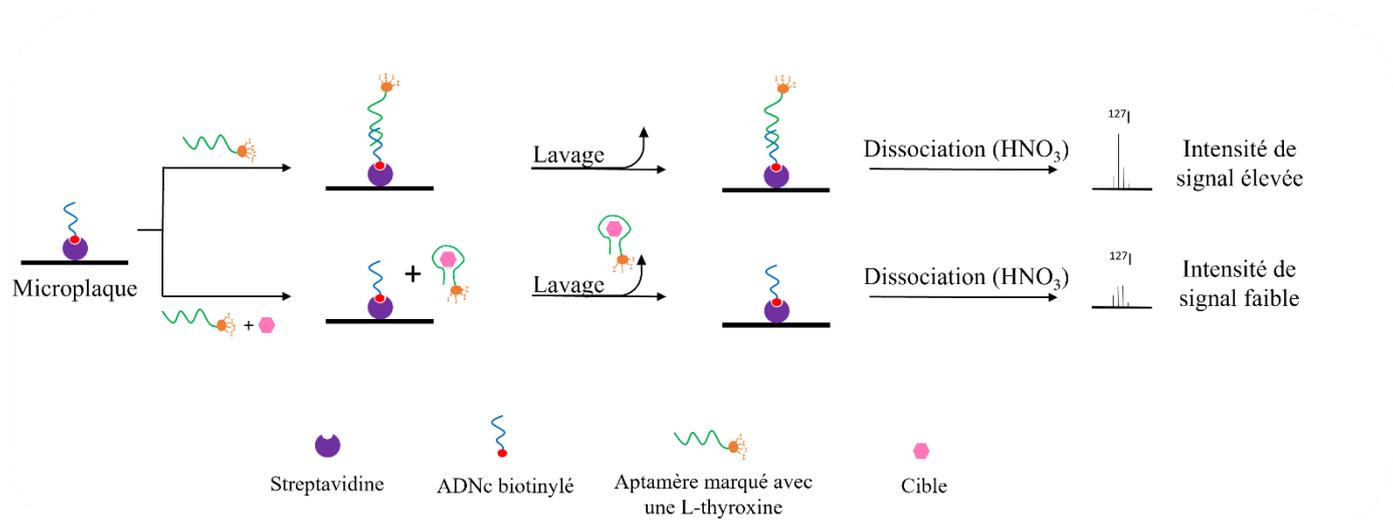


Figure 20. Représentation schématique de la détection de petites molécules par dosage des atomes d'iode en ICP-MS.

2. Matériels et méthodes

2.1. Réactifs utilisés

- La L-tyrosinamide (L-Tym), le Tris(hydroxyméthyl)aminométhane et le Tween 20 ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).
- La D-tyrosinamide (D-Tym) provient de chez Iris Biotech (Marktredwitz, Allemagne).
- Le chlorure de sodium (NaCl) a été acheté chez Acros Organics (Geel, Belgique).
- Le chlorure de magnésium (MgCl₂) et le dihydrogénophosphate de sodium (NaH₂PO₄) proviennent de chez Fisher Scientific (Illkirch, France).
- Une solution d'acide nitrique à 67% ultrapure pour l'analyse d'éléments traces a été achetée chez VWR (Rosny-sous-Bois, France).
- Les solutions standards d'iode proviennent de chez CPAchem (Bogomilovo, Bulgarie).

L'eau a été obtenue à l'aide d'un système de purification d'eau Direct-Q[®] 3UV (Merck Millipore, Guyancourt, France), et a été utilisée pour préparer les solutions d'analytes ainsi que les solutions tampons.

Les microplaques comprenant 8 puits streptavidine « DNA-BIND » ont été achetées auprès de Thermofisher Scientific (New Jersey, États-Unis).

Tous les oligonucléotides utilisés dans le présent travail ont été synthétisés, purifiés par HPLC et identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF par Eurogentec (Seraing, Belgique). Les séquences et abréviations sont énumérées dans le Tableau 5. La chimie de liaison entre la molécule de L-thyroxine et l'aptamère est confidentielle. Les solutions mères d'oligonucléotides ont été préparées dans de l'eau pure à une concentration de 10⁻³ mol/L et conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Tableau 5. Séquences et abréviations des oligonucléotides utilisés pour la détection de L-Tym.

Nom	5' → 3'
3'Biot-BC10	ACACACCACA-Biotine
3'Biot-BC14	ACTCACACACCACA-Biotine
5'Thyr-Apt-Tym	L-thyroxine-TGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCCC

2.2. Protocole expérimental

Une solution d'ADNc biotinylé est préparée par dilution adéquate de la solution mère dans un tampon d'immobilisation dont la composition est proposée dans le protocole associé aux microplaques (10 mM Tris, 2 M NaCl, pH 7,5). Elle est ensuite chauffée à 80°C pendant 5 minutes et laissée au repos à température ambiante pendant 30 minutes. Un volume de 100 µL de cette solution est ajouté dans chaque puits de la microplaque de façon à obtenir une concentration de 1 µM. Après 90 minutes d'incubation à température ambiante sous faible agitation, les puits sont lavés trois fois avec 200 µL d'un tampon de lavage (10 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.05% Tween 20, pH 7,5) afin d'éliminer l'ADNc non lié.

Une solution d'aptamère fonctionnalisé avec une molécule de L-thyroxine est préparée par dilution adéquate de la solution mère dans un tampon de complexation similaire à celui utilisé dans un travail précédent (10 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,5).¹⁷⁴ Elle est ensuite chauffée à 80°C pendant 5 minutes et laissée au repos à 4°C ou à température ambiante pendant 30 minutes.

Des dilutions successives des solutions mères de L- ou D-Tym sont effectuées dans le tampon de complexation. Un volume de 100 µL d'un mélange contenant l'aptamère (concentration finale = 500 nM, sauf indication contraire) et la cible correspondante (concentration finale de 0 à 400 µM) est ajouté dans chaque puits et incubé pendant 5 minutes à 4°C ou à température ambiante sous faible agitation.

Après une étape de lavage, 125 μL d'acide nitrique dilué de moitié dans de l'eau pure sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 40 minutes à température ambiante sous faible agitation. Le contenu des puits est ensuite récupéré pour une analyse par ICP-MS.

La quantité d'iode présent dans les différents échantillons est déterminée à l'aide d'un appareillage ICP-MS quadripolaire (Perkin Elmer NexION 2000, Waltham, MA, États-Unis). Les échantillons, contenant 50% d'acide nitrique (v/v) (sauf indication contraire), sont dilués dans de l'eau pure 1:50 avant l'analyse. Les solutions standards d'iode sont préparées dans de l'acide nitrique 1% (v/v). L'isotope ^{127}I est mesuré en utilisant ^{103}Rh comme étalon interne.

Il faut également noter que l'iode est généralement dosé en milieu alcalin afin de limiter l'effet mémoire et la volatilité, qui pourraient entraîner des biais dans les résultats de dosage. Le laboratoire du CHU de Grenoble participe régulièrement au programme d'évaluation externe de la qualité (EEQ) du Centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) pour la détermination de l'iode urinaire. Ce programme, intitulé EQUIP (Ensuring the Quality of Urinary Iodine Procedures), vise à confronter les méthodes d'analyse employées par différents laboratoires à une méthode de référence. La technique utilisée par le CDC est réalisée en milieu alcalin, permettant une comparaison pertinente avec la méthode en milieu acide utilisée dans notre pratique hospitalière et dans le présent travail. La Figure 21 expose une compilation des données issues de 26 échantillons différents entre Mars 2021 et Mars 2023, comparées avec les valeurs cibles du CDC. Les zones délimitées en rouge représentent les seuils acceptables fixés par le CDC, lesquels sont présentés dans le Tableau 6.

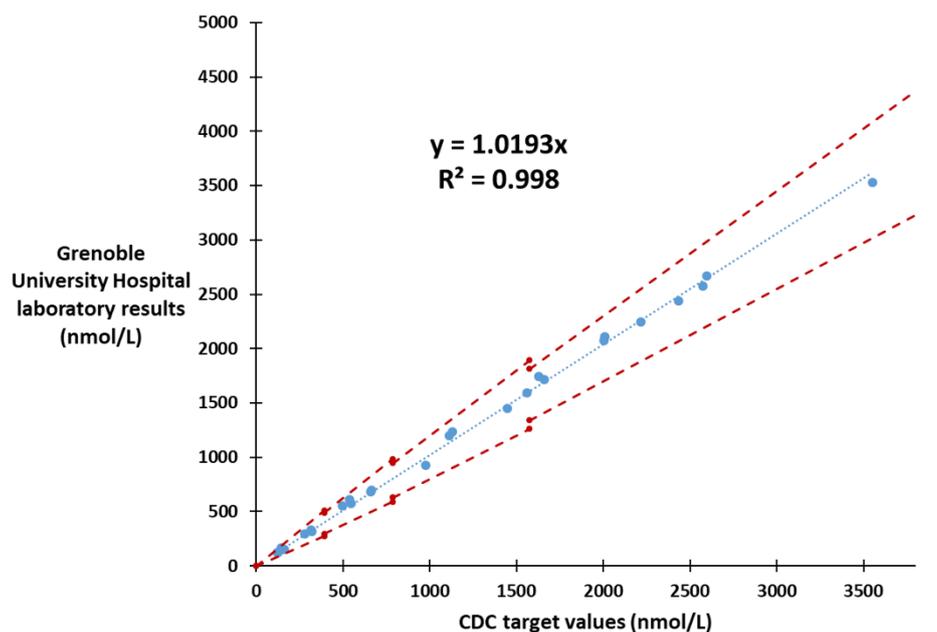


Figure 21. Résultats du dosage de l'iode urinaire du laboratoire du CHU de Grenoble en fonction des valeurs cibles du CDC.

Tableau 6. Seuils acceptables fixés par le CDC pour le dosage de l'iode urinaire.

Seuils de concentrations (nmol/L)	Biais assigné
< 394	30%
394 - 788	25%
788 - 1576	20%
> 1576	15%

Les résultats obtenus par le laboratoire du CHU de Grenoble se situent au sein des limites acceptables, avec une pente de régression linéaire très proche de 1 et une ordonnée à l'origine égale à zéro. Cela démontre que l'analyse en milieu acide est pertinente, notamment lorsque les analyses sont effectuées après la préparation de l'échantillon et lorsque des étapes de rinçage

sont introduites entre les différentes séries de passages. Ces étapes de rinçage sont effectuées avec une solution d'acide nitrique à 1% et durent environ 5 minutes.

2.3. Approche statistique de l'analyse des données

La procédure d'ajustement a été réalisée avec l'algorithme Excel Solver (méthode des moindres carrés) en modélisant chaque courbe dose-réponse à partir d'analyses indépendantes selon l'équation de Langmuir suivante :

$$\frac{[Iode]_{analyte}}{[Iode]_{libre}} = S = 1 - \frac{\Delta S_{max}}{1 + \left(\frac{K_d^{app}}{c_{analyte}} \right)}$$

- $[Iode]_{analyte}$ et $[Iode]_{libre}$ sont les concentrations en iode en présence et en absence de cible, respectivement. S est la concentration en iode normalisée correspondante.
- ΔS_{max} correspond à la variation maximale de la concentration en iode au sein d'une courbe dose-réponse.
- K_d^{app} représente la constante de dissociation apparente.
- $C_{analyte}$ est la concentration totale de la cible.

La limite de détection a été estimée par la méthode des 3σ , selon l'équation suivante :

$$S_{blanc} = 1 - \frac{\sigma_{blanc}}{m_{blanc}} \times 3$$

- S_{blanc} correspond au signal normalisé dont la concentration correspondante correspond à la limite de détection.
- σ_{blanc} correspond à l'écart-type du blanc.
- m_{blanc} représente la moyenne du blanc

Le calcul de la limite de détection est alors possible grâce aux deux équations ci-dessus :

$$C = \frac{K_d^{app} - S_{blanc} \times K_d^{app}}{\Delta S_{max} - 1 + S_{blanc}}$$

Avec C correspondant à la limite de détection de l'analyte.

3. Résultats et discussion

3.1. Détection de la L-tyrosinamide

L'aptamère dirigé contre la L-tyrosinamide est régulièrement utilisé pour étudier la faisabilité d'une méthode dans le développement de biocapteurs et d'essais à base d'aptamère.¹⁷⁵⁻¹⁸¹ Bien que la structure secondaire précise de cet aptamère ne soit pas encore connue,^{182,183} une version tronquée de 23 bases (23mer) a été identifiée par Challier *et al.* comme étant la séquence minimale nécessaire pour se lier à la cible avec une affinité satisfaisante.¹⁸³ Dans le cadre de notre projet, une molécule de L-thyroxine est fonctionnalisée à l'extrémité 5' de cet aptamère (5'Thyr-Apt-Tym, voir Tableau 5).

3.1.1. Optimisation des conditions expérimentales

3.1.1.1. Longueur du brin d'ADNc

Des travaux antérieurs ont démontré l'importance de la longueur du brin d'ADNc pour assurer une hybridation correcte entre ce dernier et l'aptamère sans compromettre la liaison entre l'aptamère et sa cible.^{173,177,184} Deux oligonucléotides contenant 10 et 14 bases respectivement (3'Biot-BC10, 3'Biot-BC14, voir Tableau 5) ont été évalués. Les résultats présentés dans le Tableau 7 et la Figure 22 indiquent une diminution du signal légèrement plus importante avec le 3'Biot-BC10. Cet oligonucléotide a donc été sélectionné pour les expériences ultérieures.

Tableau 7. Concentrations en iode normalisées obtenues avec deux ADNc (3'Biot-BC10 et 3'Biot-BC14).

[L-Tym] (μM)	[Iode] _{analyte} /[Iode] _{libre}	
	3'Biot-BC10	3'Biot-BC14
0	1,000	1,000
0,1	0,967	1,155
1	0,949	1,017
10	0,671	0,824
100	0,495	0,621
1000	0,453	0,597

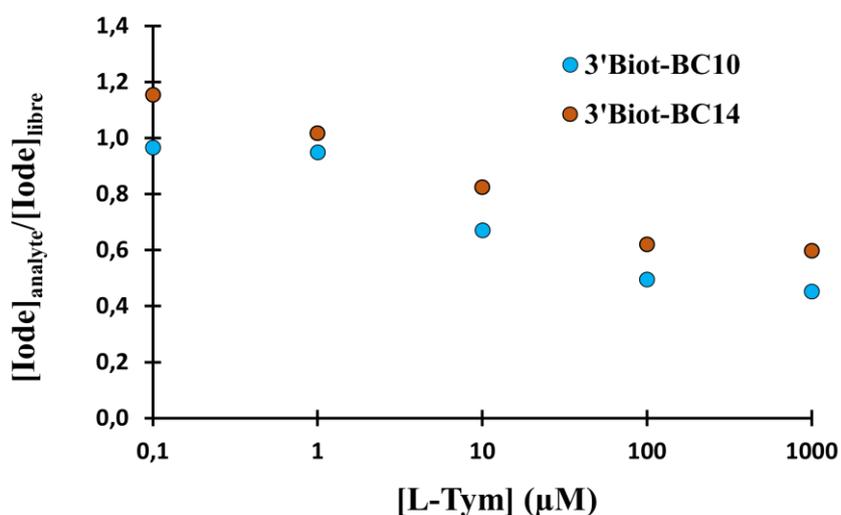


Figure 22. Courbes dose-réponse avec évaluation de deux ADNc (3'Biot-BC10 et 3'Biot-BC14). Conditions expérimentales : 1 μM d'ADNc, 500 nM de 5'Thyr-Apt-Tym, incubation avec 50% d'acide nitrique pendant 40 minutes à 25°C. Les expérimentations ont été effectuées en monoplicats.

3.1.1.2. Conditions d'incubation avec l'acide nitrique

L'analyse de l'échantillon final requiert une étape de dissociation de l'aptamère par addition d'acide nitrique dans le milieu. Différents temps d'incubation et dilutions d'acide nitrique ont été évalués en l'absence de cible, soit lorsque le signal en ICP-MS devrait être maximal. Comme le montre la Figure 23A, une dilution de 50% a conduit à un signal plus

important par rapport à l'acide nitrique non dilué. De plus, aucune différence significative entre les signaux obtenus après 40 minutes ou 15 heures n'a été constatée.

Des concentrations plus faibles d'acide nitrique ont également été testées, allant de 6,25% à 50% de la solution mère commerciale. La Figure 23B montre une réponse plus élevée au fur et à mesure que la concentration en acide nitrique augmentait.

Par conséquent, une incubation de 40 minutes avec 50% d'acide nitrique a été choisie.

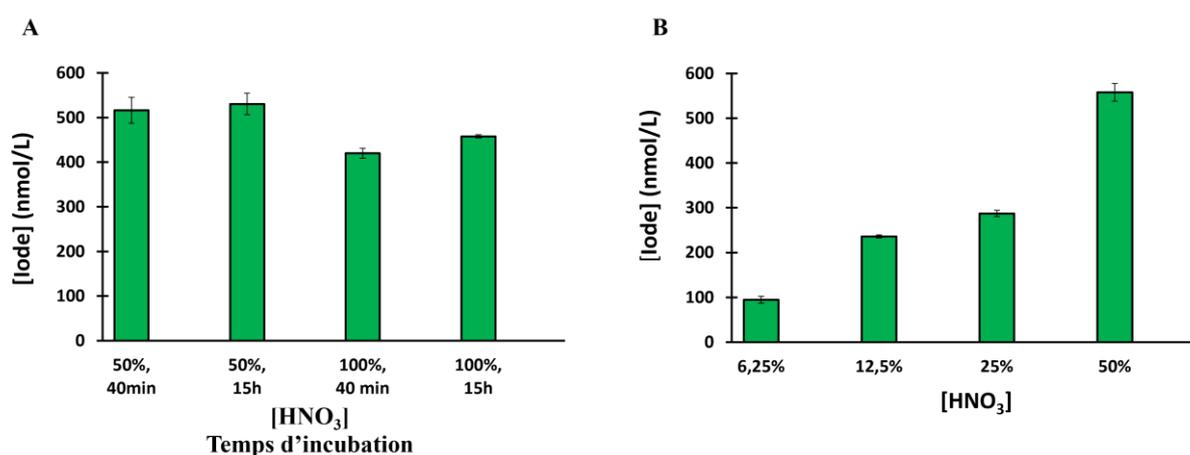


Figure 23. Effets de la dilution de l'acide nitrique ajouté aux puits (50% *versus* 100%) et du temps d'incubation (40 min *versus* 15 h) sur la dissociation de l'hybride formé par l'ADNc et l'aptamère, en l'absence de la cible.

A. Concentration d'iode en fonction de l'acide nitrique à 50% ou non dilué, selon deux temps d'incubation. **B.** Pour un temps d'incubation de 40 minutes, concentration d'iode en fonction de quantités d'acide nitrique entre 6,25% et 50%.

Conditions expérimentales : 1 μ M de 3'Biot-BC10, 500 nM de 5'Thyr-Apt-Tym, température de 25°C. Les expérimentations ont été effectuées en duplicats.

3.1.1.3. Concentration en aptamère

La quantité de 5'Thyr-Apt-Tym ajoutée dans les puits peut également jouer un rôle majeur dans la reconnaissance effective de la cible, et donc sur la réponse obtenue. Des courbes

dose-réponse ont été effectuées avec une concentration en aptamère variant de 250 à 2000 nM. Le temps d'incubation entre l'aptamère et la L-Tym a été fixé à 5 minutes. D'après la Figure 24, la réponse la plus élevée a été obtenue pour une concentration d'aptamère de 500 nM, avec une diminution maximale du signal d'environ 55 à 60%.

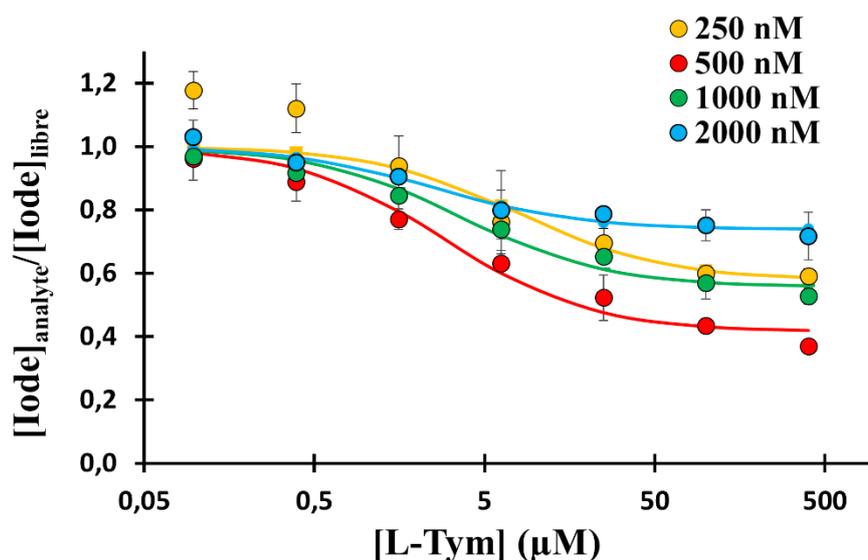


Figure 24. Courbes dose-réponse avec évaluation de différentes concentrations de 5'Thyr-Apt-Tym. Conditions expérimentales : 1 μM de 3'Biot-BC10, température de 25°C, incubation aptamère-cible pendant 5 minutes, incubation finale avec 50% d'acide nitrique pendant 40 minutes. Les expérimentations ont été effectuées en duplicats.

De plus, nous avons déterminé les valeurs de $K_{1/2}$, une constante directement liée à l'affinité et qui représente la concentration de cible nécessaire pour obtenir 50% de l'écart absolu du signal. D'après le Tableau 8, une valeur de $K_{1/2}$ optimale (2,9 μM) a également été obtenue pour une concentration en aptamère de 500 nM. Étant donné que la constante de dissociation en solution du complexe formé par la L-tyrosinamide et son aptamère est d'environ 0,8 μM dans des conditions de reconnaissance similaires (10 mM de $MgCl_2$, à température ambiante),¹⁷⁸ ces données suggèrent que notre stratégie a peu d'impact sur l'affinité globale de l'aptamère pour sa cible.

Tableau 8. Valeurs de $K_{1/2}$ estimées pour le 5'Thyr-Apt-Tym et la L-tyrosinamide.

[5'Thyr-Apt-Tym] (nM)	$K_{1/2}$ (μ M)
250	$8,5 \pm 2,9$
500	$2,9 \pm 0,01$
1000	$3,7 \pm 2,0$
2000	N/A

3.1.1.4. Conditions d'incubation du complexe aptamère-cible

Le temps d'incubation optimal pour la formation du complexe aptamère-cible a été rapidement investigué. Nos expériences (Figure 25) ainsi que des études antérieures ont montré qu'un temps d'incubation de 5 minutes entre l'aptamère et sa cible était suffisant pour atteindre l'équilibre.

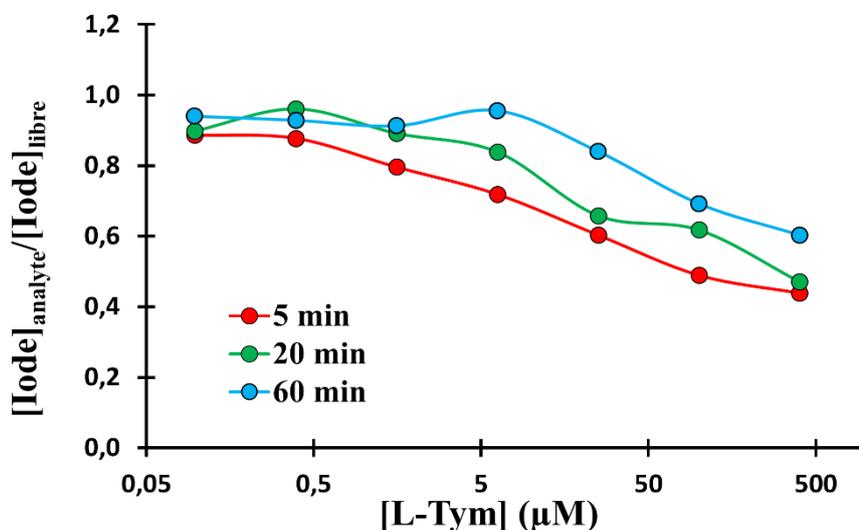


Figure 25. Courbes dose-réponse avec évaluation de trois temps d'incubation aptamère-cible.

Conditions expérimentales : 1 μ M de 3'Biot-BC10, 500 nM de 5'-Thyr-Apt-Tym, température de 25°C, incubation avec 50% d'acide nitrique pendant 40 minutes. Les expérimentations ont été effectuées en monoplicats.

La température d'incubation entre l'aptamère et sa cible a ensuite été étudiée. Il a été antérieurement rapporté que l'interaction entre la L-Tym et son aptamère était grandement améliorée à basse température.¹⁷⁶ Dans ce contexte, des expériences à 4°C ont été menées, en utilisant les conditions expérimentales optimales déterminées précédemment. D'après la Figure 26, un déplacement notable de la courbe dose-réponse vers la gauche est constaté à 4°C, avec une valeur de $K_{1/2}$ divisé par 5,5 (de $2,22 \pm 0,008 \mu\text{M}$ à $0,4 \pm 0,016 \mu\text{M}$) sans perte de signal maximal, suggérant une amélioration de l'affinité de l'aptamère pour sa cible.

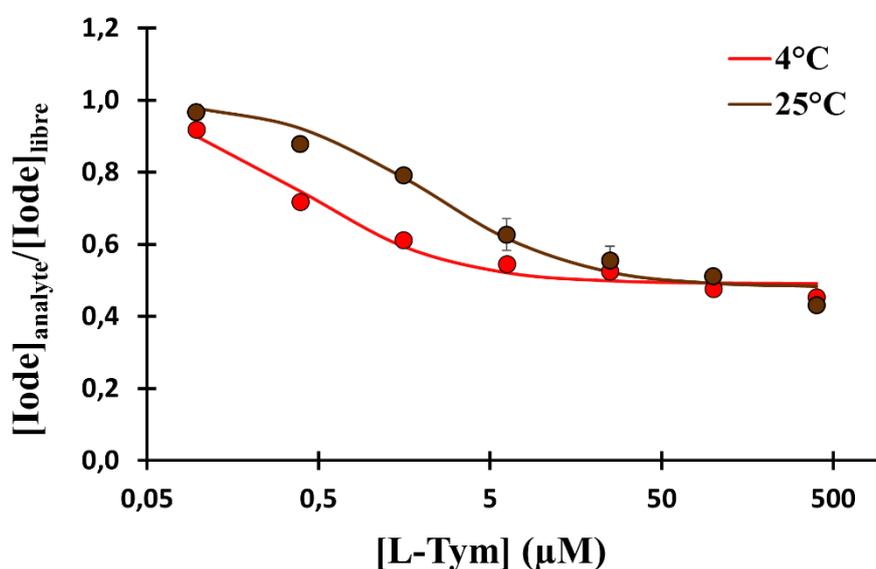


Figure 26. Courbes dose-réponse avec évaluation de deux températures d'incubation aptamère-cible (25°C et 4°C). Conditions expérimentales : 1 μM de 3'Biot-BC10, 500 nM de 5'-Thyr-Apt-Tym, incubation aptamère-cible pendant 5 minutes, incubation avec 50% d'acide nitrique pendant 40 minutes. Les expérimentations ont été effectuées en duplicats.

3.1.1.5. Récapitulatif

Le Tableau 9 ci-dessous récapitule les différentes conditions testées selon le paramètre expérimental évalué ainsi que la condition optimale retenue pour chacun d'entre eux.

Tableau 9. Tableau récapitulatif des conditions expérimentales testées et optimales.

Paramètre	Conditions testées	Condition optimale retenue
Longueur ADNc	10 bases 14 bases	10 bases
Concentration en HNO ₃	6,25% - 12,5% - 25% - 50% - 100%	50 %
Temps d'incubation HNO ₃	40 minutes 15 heures	40 minutes
Concentration en aptamère 5'Thyr-Apt-Tym	250 nM – 500 nM – 1000 nM – 2000 nM	500 nM
Temps d'incubation aptamère- cible	5 minutes – 20 minutes – 60 minutes	5 minutes
Température d'incubation aptamère-cible	4°C 25°C	4°C

3.1.2. Performances analytiques et spécificité

Les conditions optimales résumées dans le Tableau 9 ont été utilisées pour réaliser la courbe dose-réponse présentée dans la Figure 27. En se basant sur cette courbe, la limite de détection a été déterminée et estimée à 60 nmol/L.

Pour évaluer la spécificité de notre stratégie, l'aptamère 5'Thyr-Apt-Tym a été incubé en présence de D-tyrosinamide, l'énantiomère de la cible d'intérêt qui ne devrait pas être reconnu.^{176,178} Comme présenté dans la Figure 27, l'ajout de D-Tym n'a pas entraîné de diminution significative du signal, montrant que notre méthode est sélective pour la détection de la L-Tym.

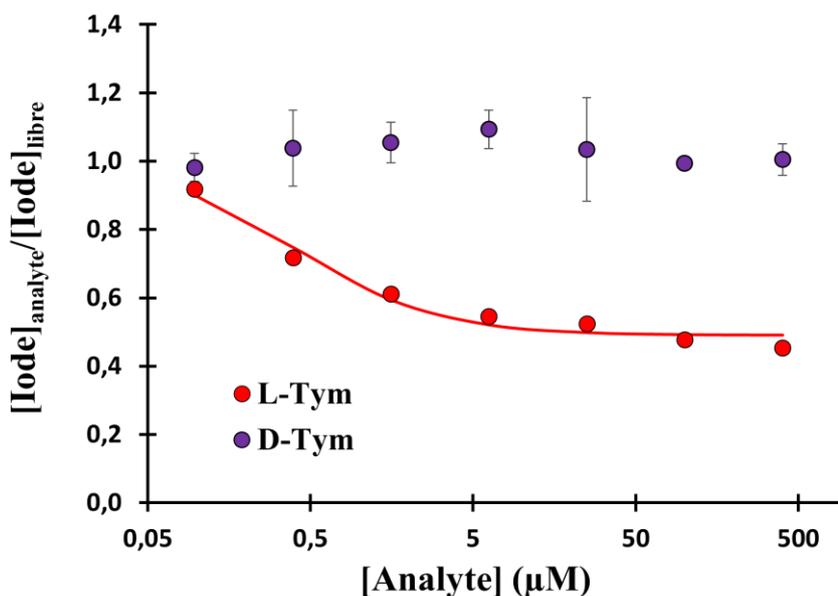


Figure 27. Courbes dose-réponse pour la détection de L-Tym (issue de la Figure 26), et évaluation de la spécificité.

Des investigations complémentaires ont été conduites pour s'assurer que la méthode ne génère pas de bruit de fond significatif. Une éventuelle adsorption non-spécifique de l'aptamère 5'Thyr-Apt-Tym a été évaluée en effectuant des expériences sans immobilisation de brin d'ADNc au fond des puits. Les résultats présentés dans la Figure 28 indiquent une adsorption négligeable de l'aptamère. Par ailleurs, en présence du 3'Biot-CS10 seul, aucun signal n'a été détecté.

Nous avons également évalué les interférences potentielles que pourraient occasionner la présence d'iode dans des matrices complexes. Les expériences ont été effectuées en introduisant des échantillons enrichis avec 1 μM d'une solution standard d'iode, avec ou sans immobilisation d'ADNc au fond des puits, et en absence de l'aptamère 5'Thyr-Apt-Tym. Comme montré dans la Figure 28, le signal obtenu par l'ICP-MS demeure limité, ne dépassant pas 10% de celui enregistré avec l'hybride aptamère-ADNc. Cela suggère que la présence d'iode endogène dans les milieux biologiques ne devrait pas provoquer d'interférences indésirables.

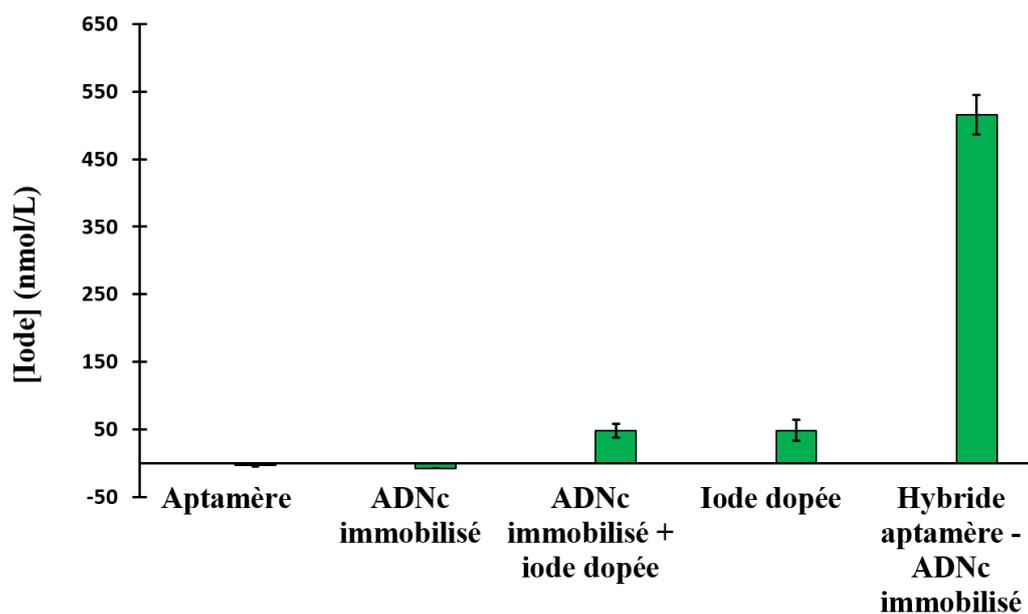


Figure 28. Évaluation des interférences potentielles par l'étude du signal d'iode provenant de différentes expériences de contrôle. **De gauche à droite** : 1 μM de 5'Thyr-Apt-Tym seulement, 1 μM de 3'Biot-CS10 seulement, 1 μM de 3'Biot-CS10 en présence d'1 μM d'iode, 1 μM d'iode seulement. À droite est représenté le signal obtenu avec l'hybride immobilisé (1 μM de 3'Biot-CS10 et 500 nM de 5'Thyr-Apt-Tym). Conditions expérimentales : température de 25°C, incubation avec 50% d'acide nitrique pendant 40 minutes.

3.2. Détection de la thrombine

Afin de démontrer son applicabilité à d'autres systèmes aptamère-cible, cette stratégie de marquage a été employée pour la détection d'un autre analyte modèle, l' α -thrombine. Étant donné qu'il s'agit d'une protéine, une approche de type « sandwich » est envisageable par l'utilisation de deux aptamères décrits dans la littérature et capables de reconnaître différentes régions de la thrombine.¹⁸⁵ Les séquences de ces aptamères sont référencées dans le Tableau 10 ; l'aptamère 5'Biot-Apt-Thb1 se caractérise par une structure secondaire de type G-

quadruplex-duplex, tandis que l'aptamère 5'Thyr-Apt-Thb2 adopte une configuration en G-quadruplex.¹⁸⁶

Tableau 10. Séquences et abréviations des oligonucléotides utilisés pour la détection de thrombine

Nom	5' → 3'
5'Biot-Apt-Thb1	Biotine-AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT
5'Thyr-Apt-Thb2	L-thyroxine-GGTTGGTGTGGTTGG

Le principe de la méthode est représenté dans la Figure 29. Lors de l'ajout de cible, un complexe ternaire est formé avec un aptamère de capture immobilisé au fond d'une microplaque (5'Biot-Apt-Thb1) et un second aptamère marqué avec une molécule de L-thyroxine (5'Thyr-Apt-Thb2). Contrairement à la méthode employée pour la détection de la L-Tym, le signal obtenu par ICP-MS devrait augmenter à mesure que la concentration de thrombine dans l'échantillon est croissante.

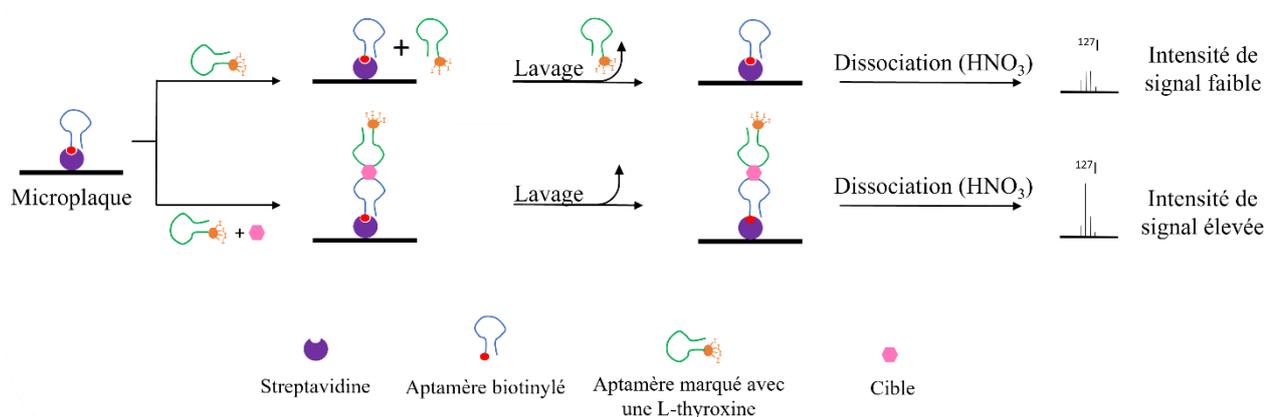


Figure 29. Représentation schématique de la détection de protéines par dosage des atomes d'iode en ICP-MS.

Les expériences ont été effectuées par le Dr Benoit CHOVELON à l'Université Carleton à Ottawa (Canada). En raison de la nature différente de la cible, une modification a été apportée au tampon de complexation par rapport à celui décrit précédemment afin de mieux correspondre aux conditions de sélection des aptamères (20 mM Tris, 120 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, pH 7,4).¹⁸⁶

Les conditions expérimentales optimales sont légèrement modifiées afin d'améliorer la sensibilité. Les aptamères 5'Biot-Apt-Thb1 et 5'Thyr-Apt-Thb2 sont ajoutés à une concentration deux fois plus élevée par rapport à la détection de L-Tym, soit 2 µM et 1 µM respectivement. Le temps d'incubation privilégié après ajout de cible est de 30 minutes. Les conditions d'ajout d'HNO₃, quant à elles, demeurent inchangées.

Dans ces conditions, une courbe dose-réponse a été réalisée, allant de 0 à 500 nM de thrombine. La limite de détection a été estimée à environ 40 nM. La spécificité a été évaluée en utilisant de la BSA, laquelle a donné lieu à une absence de signal, confirmant la sélectivité de la méthode pour la thrombine (Figure 30).

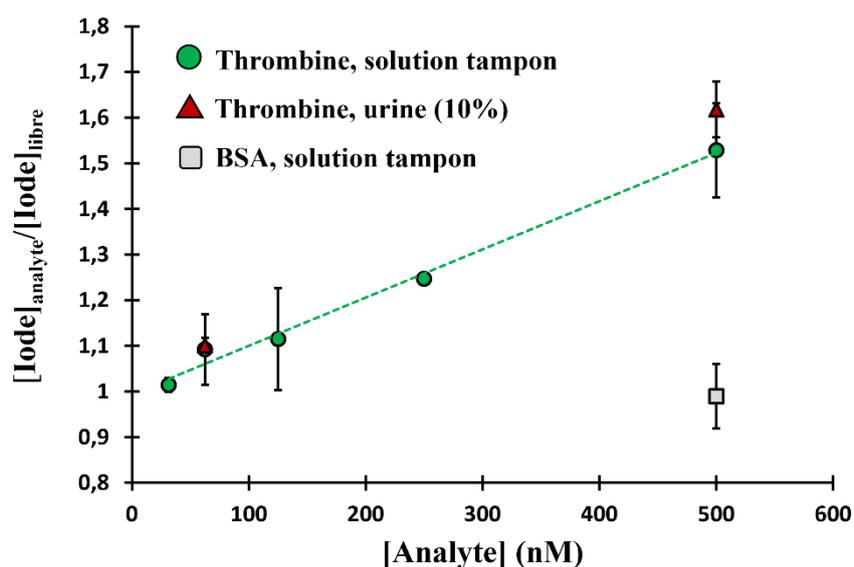


Figure 30. Courbes dose-réponse pour la détection de thrombine, avec évaluation de la spécificité et test en milieu urinaire.

La faisabilité de la méthode a été évaluée en milieu complexe en testant son aptitude à détecter la thrombine dans de l'urine humaine. Cette matrice contient naturellement divers composés tels que la créatinine, l'urée, des ions et des protéines, qui peuvent générer des interférences. L'urine utilisée ici provient d'un contrôle externe de la qualité utilisé en laboratoire d'analyse, et contient une concentration en protéines relativement proche de la limite physiologique ($< 0,15 \text{ g}/24\text{h}$). La thrombine en concentrations connues (62,5 et 500 nM) a été ajoutée à un échantillon d'urine dilué à 10%. Comme présenté dans la Figure 30 ci-dessus, le signal mesuré est comparable à celui obtenu dans la solution tampon. Étant donné que la concentration urinaire de thrombine endogène est de l'ordre du pmol/L,¹⁸⁷ le signal détecté peut être considéré comme provenant de la cible ajoutée. Ces résultats sont encourageants et démontrent la possibilité de notre approche à fonctionner dans des matrices complexes diluées.

3.3. Tentatives d'amplification du signal

Compte tenu de la faible quantité d'atomes d'iode présents au sein de notre marqueur, quelques conceptions alternatives ont été élaborées pour tenter d'amplifier le signal mesuré par ICP-MS.

Dans un premier temps, une approche consistant à ajouter 16 bases cytosines iodées en plus de la partie aptamérique spécifique de la L-Tym a été envisagée (Figure 31). Un quadruplement du signal était attendu, mais les résultats obtenus étaient insatisfaisants et inférieurs à ceux obtenus avec notre système précédent.



Figure 31. Séquence de l'oligonucléotide composé de l'aptamère anti-L-Tym et d'un poly-iodo-C.

Des études antérieures ont révélé que les atomes d'iode interagissent avec les atomes d'oxygènes des groupements phosphates de l'aptamère par le biais de liaisons halogène (Figure 32), ce qui pourrait entraîner un auto-repliement de l'oligonucléotide, empêchant son hybridation avec l'ADNc ainsi que la reconnaissance aptamère-cible.^{188,189}

Différentes options ont été testées pour réduire ces interactions, notamment l'ajout d'un ADN non spécifique, d'ATP à forte concentration, ou encore d'un brin poly-G, mais aucune de ces tentatives n'a été concluante.

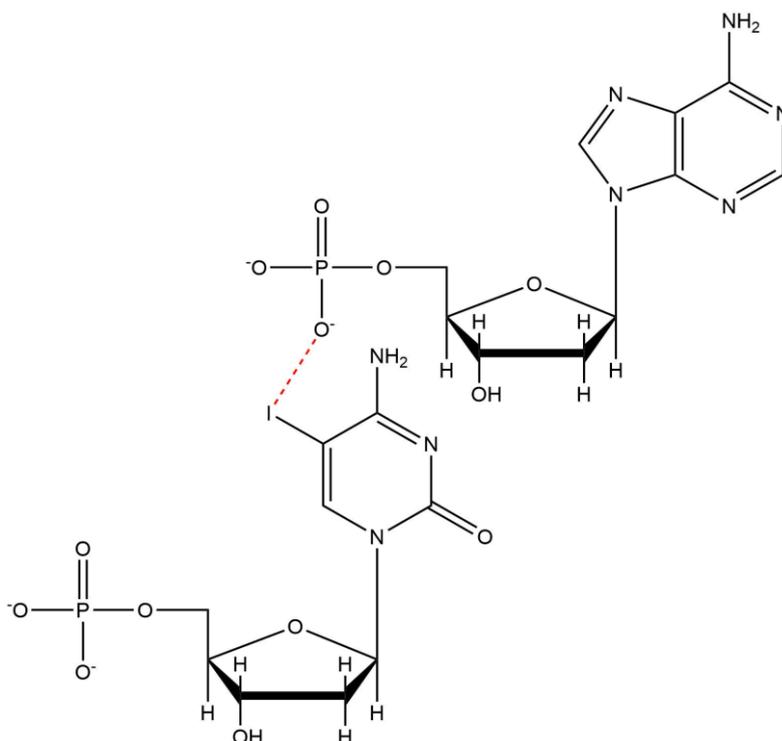


Figure 32. Représentation de la liaison halogène entre un atome d'iode provenant d'une cytosine et un atome d'oxygène d'un groupement phosphate d'une adénine.

Un nouvel oligonucléotide a alors été conçu afin de résoudre cette interférence. Cette nouvelle séquence contient 16 bases uridines iodées avec l'intégration d'un poly-T entre la partie aptamérique et les bases iodées. Pour éviter le repliement des iodo-uridines sur la partie aptamérique, un poly-A a été ajouté à l'extrémité 3' de sorte à former une boucle après interaction avec le poly-T ou les uridines (Figure 33).

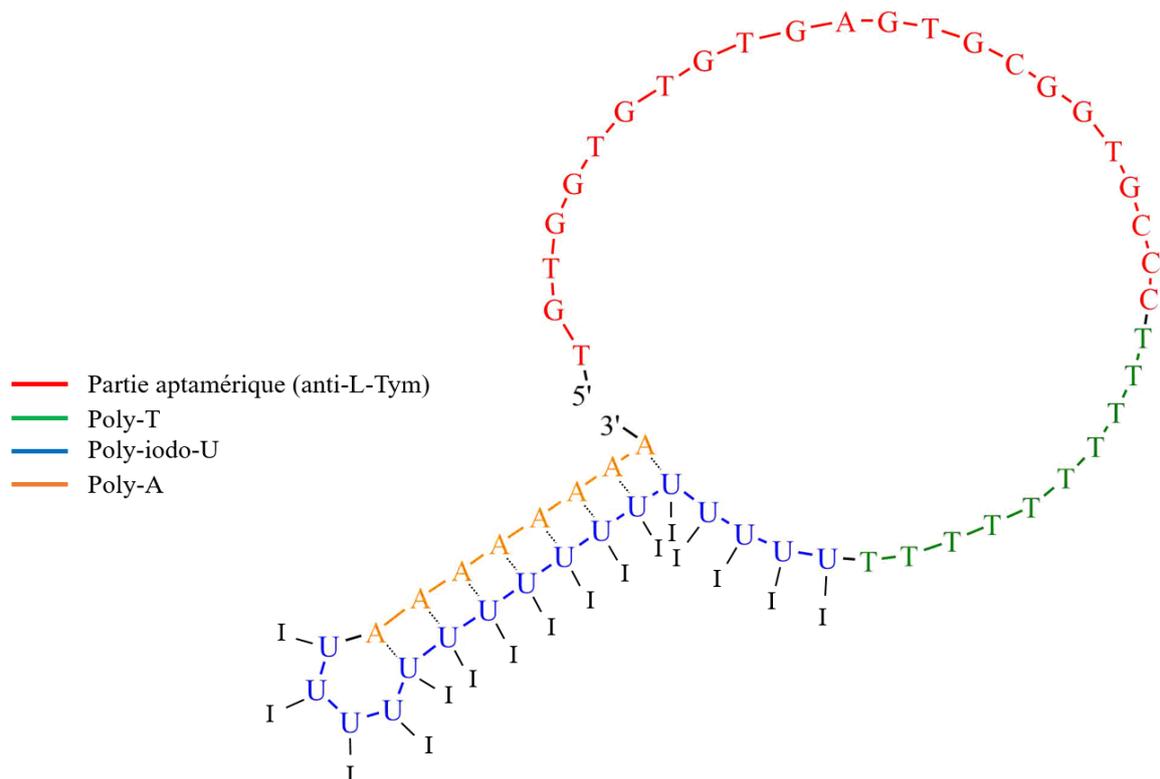


Figure 33. Représentation de l'oligonucléotide composé de l'aptamère anti-L-Tym et d'un poly-iodo-U selon le logiciel Mfold.

Selon les résultats présentés dans la Figure 34, le design imaginé a permis de minimiser la présence des liaisons halogène mentionnées ci-dessus. Cependant, le processus d'ajustement des courbes dose-réponse obtenues s'est avéré fastidieux, et cette configuration n'offre pas d'avantages supplémentaires par rapport à un marquage par la L-thyroxine, que ce soit en termes d'affinité ou de limite de détection.

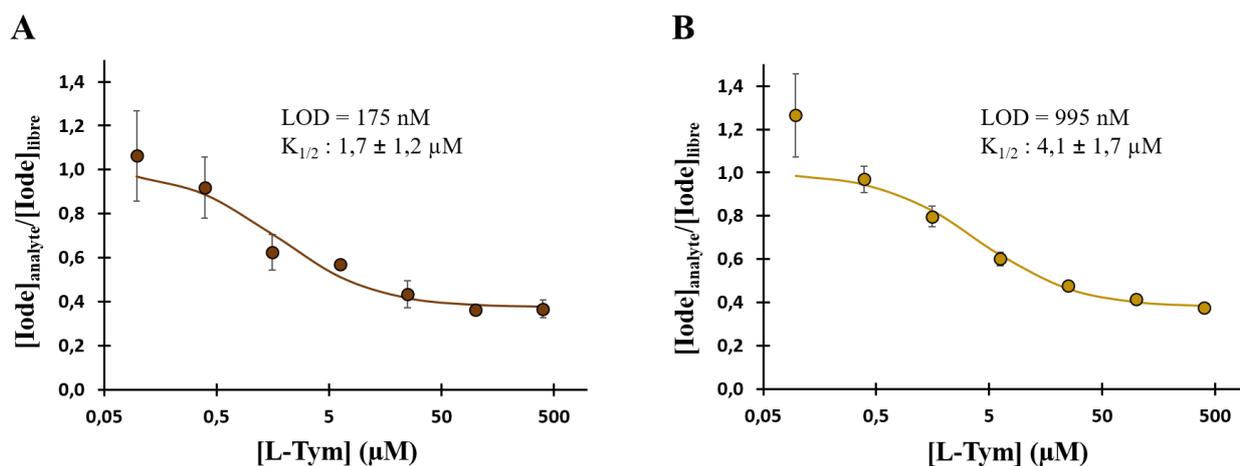


Figure 34. Courbes dose-réponse pour la détection de L-Tym avec utilisation d'un oligonucléotide Poly-iodoU-Apt-Tym.

Conditions expérimentales : 1 μM de 3'Biot-BC10, 1 μM de Poly-iodoU-Apt-Tym, incubation aptamère-cible pendant 5 minutes, incubation avec 50% d'acide nitrique pendant 40 minutes. Température de 4°C (**A**) ou 25°C (**B**). Les expérimentations ont été effectuées en duplicats.

D'autres stratégies d'amplification ont été suggérées, comme par exemple l'utilisation d'une molécule synthétique poly-iodée en tant que marqueur, ou encore la création d'un système dendrimère avec une molécule de L-thyroxine sur chaque branche. Bien qu'elles n'aient pas été étudiées, il pourrait être intéressant d'explorer davantage ces pistes.

Conclusion

À ce jour, la majorité des essais utilisant des acides nucléiques comme agents de reconnaissance avec analyse par ICP-MS ont été développés dans le cadre de la détection de matériel génétique. Les différentes stratégies présentées ont montré une sensibilité importante, avec des limites de détection pouvant atteindre l'attomolaire, soit 10^{-18} mol/L. L'utilisation croissante d'aptamères en tant qu'éléments de reconnaissance a permis d'étendre les applications de ce genre d'essai à la détection d'autres types de cibles de tailles diverses telles que des petites molécules, des protéines, ou encore des bactéries et des cellules. Avec des limites de détection avoisinant le picomolaire (10^{-12} mol/L) voire le femtomolaire (10^{-15} mol/L), les essais à base d'aptamères gagnent rapidement en importance dans l'arsenal des techniques diagnostiques.

En outre, il est important de noter un développement croissant de méthodes multiplexées pour l'analyse simultanée de plusieurs cibles, répondant ainsi à la demande actuelle visant à améliorer le diagnostic, en particulier dans les domaines de l'infectiologie et de l'oncologie.

Parmi les 57 publications recensées dans ce manuscrit, les stratégies de marquage les plus fréquemment retrouvées sont les nanoparticules élémentaires, qui ont été employées dans 38 d'entre-elles, suivies par les chélates de lanthanides, utilisés dans 16 études. Quelques approches différentes ont également été explorées, telles que l'utilisation d'ions mercure ou d'un complexe à base de ruthénium. Cependant, ces approches sont limitées à des conditions très particulières comme la nécessité de disposer d'un ADN double brin, ou bien d'avoir un certain nombre de thymine dans la séquence oligonucléotidique.

Ainsi, notre travail visait à proposer une stratégie de marquage innovante en utilisant une molécule organique simple, la L-thyroxine, porteuse de plusieurs atomes d'iode détectables

par ICP-MS. Notre preuve de concept a permis de détecter deux cibles de nature différente, la L-tyrosinamide et la thrombine, avec une limite de détection de l'ordre du nanomolaire (10^{-9} mol/L). De plus, l'utilisation de cette approche dans deux schémas différents de détection, à savoir un schéma compétitif et un schéma « sandwich », démontre sa versatilité.

De toute évidence, les performances analytiques de notre essai sont intrinsèquement inférieures à d'autres travaux. À titre d'exemple, un travail antérieur a rapporté une limite de détection de 10 pM pour la thrombine (contre 40 nM dans le présent travail) en utilisant une méthode « sandwich » similaire, mais avec des AuNPs comme marqueurs de signal.⁸³ Cependant, le principal atout de notre approche est sa grande simplicité d'utilisation ; les sondes utilisées sont disponibles commercialement sur demande et peuvent être utilisées directement sans aucune manipulation supplémentaire. De plus, leurs fonctionnalités sont conservées pendant plusieurs années dans les conditions de stockage conventionnelles (-20°C). Enfin, la conjugaison de la L-thyroxine sur l'aptamère est un processus reproductible, constituant un avantage majeur par rapport aux stratégies de marquage conventionnelles.

Les perspectives de ce travail se concentreront sur l'évaluation de la faisabilité de notre stratégie pour d'autres systèmes aptamère-cible, ainsi que sur son application à différentes matrices complexes d'intérêt biomédical ou environnemental.

Les travaux de cette thèse ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Talanta* (voir en Annexe),¹⁹⁰ et une revue de la littérature est en cours de rédaction.

THÈSE SOUTENUE PAR : Blandine BILLET

TITRE :

Les aptamères au service du diagnostic biologique : développement d'un essai avec détection par ICP-MS.

CONCLUSION :

À ce jour, la majorité des essais utilisant des acides nucléiques comme agents de reconnaissance avec analyse par ICP-MS ont été développés dans le cadre de la détection de matériel génétique. Les différentes stratégies présentées ont montré une sensibilité importante, avec des limites de détection pouvant atteindre l'attomolaire, soit 10^{-18} mol/L. L'utilisation croissante d'aptamères en tant qu'éléments de reconnaissance a permis d'étendre les applications de ce genre d'essai à la détection d'autres types de cibles de tailles diverses telles que des petites molécules, des protéines, ou encore des bactéries et des cellules. Avec des limites de détection avoisinant le picomolaire (10^{-12} mol/L) voire le femtomolaire (10^{-15} mol/L), les essais à base d'aptamères gagnent rapidement en importance dans l'arsenal des techniques diagnostiques. En outre, il est important de noter un développement croissant de méthodes multiplexées pour l'analyse simultanée de plusieurs cibles, répondant ainsi à la demande actuelle visant à améliorer le diagnostic, en particulier dans les domaines de l'infectiologie et de l'oncologie.

Parmi les 57 publications recensées dans ce manuscrit, les stratégies de marquage les plus fréquemment retrouvées sont les nanoparticules élémentaires, qui ont été employées dans 38 d'entre-elles, suivies par les chélates de lanthanides, utilisés dans 16 études. Quelques approches différentes ont également été explorées, telles que l'utilisation d'ions mercure ou d'un complexe à base de ruthénium. Cependant, ces approches sont limitées à des conditions très particulières comme la nécessité de disposer d'un ADN double brin, ou bien d'avoir un certain nombre de thymines dans la séquence oligonucléotidique.

Ainsi, notre travail visait à proposer une stratégie de marquage innovante en utilisant une molécule organique simple, la L-thyroxine, porteuse de plusieurs atomes d'iode détectables par ICP-MS. Notre preuve de concept a permis de détecter deux cibles de nature différente, la L-tyrosinamide et la thrombine, avec une limite de détection de l'ordre du nanomolaire (10^{-9} mol/L). De plus, l'utilisation de cette approche dans deux schémas différents de détection, à savoir un schéma compétitif et un schéma « sandwich », démontre sa versatilité.

De toute évidence, les performances analytiques de notre essai sont intrinsèquement inférieures à d'autres travaux. À titre d'exemple, un travail antérieur a rapporté une limite de détection de 10 pM pour la thrombine (contre 40 nM dans le présent travail) en utilisant une méthode « sandwich » similaire, mais avec des AuNPs comme marqueurs de signal. Cependant, le principal atout de notre approche est sa grande simplicité d'utilisation ; les sondes utilisées sont disponibles commercialement sur demande et peuvent être utilisées directement sans aucune manipulation supplémentaire. De plus, leurs fonctionnalités sont conservées pendant plusieurs années dans les conditions de stockage conventionnelles (-20°C). Enfin, la conjugaison de la L-thyroxine sur l'aptamère est un processus reproductible, constituant un avantage majeur par rapport aux stratégies de marquage conventionnelles.

Les perspectives de ce travail se concentreront sur l'évaluation de la faisabilité de notre stratégie pour d'autres systèmes aptamère-cible, ainsi que sur son application à différentes matrices complexes d'intérêt biomédical ou environnemental.

Les travaux de cette thèse ont fait l'objet d'une publication dans la revue Talanta (voir en Annexe), et une revue de la littérature est en cours de rédaction.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 2010/09/13

LE DOYEN DE LA
FACULTÉ DE PHARMACIE

LE DIRECTEUR / LA DIRECTRICE DE THÈSE



Pr Michel SÈVE

Pr Eric PEYRIN



Références bibliographiques

- (1) Houk, R. S.; Fassel, V. A.; Flesch, G. D.; Svec, H. J.; Gray, A. L.; Taylor, C. E. Inductively Coupled Argon Plasma as an Ion Source for Mass Spectrometric Determination of Trace Elements. *Anal. Chem.* **1980**, 52 (14), 2283–2289.
- (2) Amais, R. S.; Donati, G. L.; Zezzi Arruda, M. A. ICP-MS and Trace Element Analysis as Tools for Better Understanding Medical Conditions. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2020**, 133, 116094.
- (3) Ulrich, A.; Moor, C.; Vonmont, H.; Jordi, H.-R.; Lory, M. ICP-MS Trace-Element Analysis as a Forensic Tool. *Anal Bioanal Chem* **2004**, 378 (4), 1059–1068.
- (4) Aceto, M. 8 - The Use of ICP-MS in Food Traceability. In *Advances in Food Traceability Techniques and Technologies*; Espiñeira, M., Santaclara, F. J., Eds.; Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; Woodhead Publishing, 2016; pp 137–164.
- (5) *Recent Advances in Laser Ablation ICP-MS for Archaeology*; Dussubieux, L., Golitko, M., Gratuze, B., Eds.; Natural Science in Archaeology; Springer: Berlin, Heidelberg, 2016.
- (6) Ammann, A. A. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP MS): A Versatile Tool. *J. Mass Spectrom.* **2007**, 42 (4), 419–427.
- (7) Wilschefski, S. C.; Baxter, M. R. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin Biochem Rev* **2019**, 40 (3), 115–133.
- (8) Møesch, C. Utilisation de l'ICP-MS en biologie clinique. *Ann Toxicol Anal* **2007**, 19 (1), 11–21.
- (9) Liu, Z.; Li, X.; Xiao, G.; Chen, B.; He, M.; Hu, B. Application of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry in the Quantitative Analysis of Biomolecules with Exogenous Tags: A Review. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2017**, 93, 78–101.
- (10) Liu, R.; Wu, P.; Yang, L.; Hou, X.; Lv, Y. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry-Based Immunoassay: A Review. *Mass Spectrom. Rev.* **2014**, 33 (5), 373–393.
- (11) Prashanth, L.; Kattapagari, K. K.; Chitturi, R. T.; Baddam, V. R. R.; Prasad, L. K. A Review on Role of Essential Trace Elements in Health and Disease. *J. Dr. NTR Univ. Health Sci.* **2015**, 4 (2), 75.
- (12) Zoroddu, M. A.; Aaseth, J.; Crisponi, G.; Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M. The Essential Metals for Humans: A Brief Overview. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, 195, 120–129.

- (13) Loscalzo, J. Keshan Disease, Selenium Deficiency, and the Selenoproteome. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370* (18), 1756–1760.
- (14) Murphree, C. R.; Nguyen, N. N.; Raghunathan, V.; Olson, S. R.; DeLoughery, T.; Shatzel, J. J. Diagnosis and Management of Hereditary Haemochromatosis. *Vox Sang.* **2020**, *115* (4), 255–262.
- (15) El Balkhi, S.; Trocello, J.-M.; Poupon, J.; Chappuis, P.; Massicot, F.; Girardot-Tinant, N.; Woimant, F. Relative Exchangeable Copper: A New Highly Sensitive and Highly Specific Biomarker for Wilson’s Disease Diagnosis. *Clin. Chim. Acta* **2011**, *412* (23), 2254–2260.
- (16) Haute Autorité de Santé. *Maladie de Wilson - Protocole National de Diagnostic et de Suivi (PNDS)*. https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2021-11/pnds_wilson_texte_8nov21.pdf (accessed 2023-03-23).
- (17) Jaishankar, M.; Tseten, T.; Anbalagan, N.; Mathew, B. B.; Beeregowda, K. N. Toxicity, Mechanism and Health Effects of Some Heavy Metals. *Interdiscip Toxicol* **2014**, *7* (2), 60–72.
- (18) World Health Organization. *Arsenic*. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/arsenic> (accessed 2023-03-23).
- (19) World Health Organization. *Intoxication au plomb et santé*. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health> (accessed 2023-03-23).
- (20) World Health Organization. *Mercure et santé*. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health> (accessed 2023-03-23).
- (21) Rockwood, A. L.; Johnson-Davis, K. L. Mass Spectrometry for Clinical Toxicology: Therapeutic Drug Management and Trace Element Analysis. *Clin Lab Med* **2011**, *31* (3), 407–428.
- (22) Winckelmann, A.; Morcillo, D.; Richter, S.; Recknagel, S.; Riedel, J.; Vogl, J.; Panne, U.; Abad, C. Determination of Lithium in Human Serum by Isotope Dilution Atomic Absorption Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2022**, *414* (1), 251–256.
- (23) Précis de Biopathologie Biomnis. *Lithium*. <https://www.eurofins-biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/LITHIUM.pdf> (accessed 2023-03-23).
- (24) Précis de Biopathologie Biomnis. *Iode*. <https://www.eurofins-biomnis.com/referentiel/liendoc/precis/IODE.pdf> (accessed 2023-03-23).
- (25) Harrington, C. F.; Taylor, A. Analytical Approaches to Investigating Metal-Containing Drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *106*, 210–217.

- (26) Downing, K.; Jensen, B. P.; Grant, S.; Strother, M.; George, P. Quantification and Clinical Application of Carboplatin in Plasma Ultrafiltrate. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *138*, 373–377.
- (27) Degueldre, C.; Favarger, P.-Y.; Bitea, C. Zirconia Colloid Analysis by Single Particle Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *518* (1), 137–142.
- (28) Degueldre, C.; Favarger, P.-Y.; Wold, S. Gold Colloid Analysis by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry in a Single Particle Mode. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *555* (2), 263–268.
- (29) Degueldre, C.; Favarger, P.-Y. Thorium Colloid Analysis by Single Particle Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Talanta* **2004**, *62* (5), 1051–1054.
- (30) Laborda, F.; Bolea, E.; Jiménez-Lamana, J. Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Nanoanalysis. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (5), 2270–2278.
- (31) Han, G.; Xing, Z.; Dong, Y.; Zhang, S.; Zhang, X. One-Step Homogeneous DNA Assay with Single-Nanoparticle Detection. *Angew. Chem.* **2011**, *123* (15), 3524–3527.
- (32) Scheffer, A.; Engelhard, C.; Sperling, M.; Buscher, W. ICP-MS as a New Tool for the Determination of Gold Nanoparticles in Bioanalytical Applications. *Anal Bioanal Chem* **2008**, *390* (1), 249–252.
- (33) Tian, X.; Jiang, H.; Hu, L.; Wang, M.; Cui, W.; Shi, J.; Liu, G.; Yin, Y.; Cai, Y.; Jiang, G. Simultaneous Multi-Element and Multi-Isotope Detection in Single-Particle ICP-MS Analysis: Principles and Applications. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2022**, *157*, 116746.
- (34) Peters, R.; Herrera-Rivera, Z.; Undas, A.; Lee, M. van der; Marvin, H.; Bouwmeester, H.; Weigel, S. Single Particle ICP-MS Combined with a Data Evaluation Tool as a Routine Technique for the Analysis of Nanoparticles in Complex Matrices. *J. Anal. At. Spectrom* **2015**, *30* (6), 1274–1285.
- (35) Montañó, M. D.; Olesik, J. W.; Barber, A. G.; Challis, K.; Ranville, J. F. Single Particle ICP-MS: Advances toward Routine Analysis of Nanomaterials. *Anal Bioanal Chem* **2016**, *408* (19), 5053–5074.
- (36) Hu, S.; Liu, R.; Zhang, S.; Huang, Z.; Xing, Z.; Zhang, X. A New Strategy for Highly Sensitive Immunoassay Based on Single-Particle Mode Detection by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **2009**, *20* (6), 1096–1103.

- (37) Liu, R.; Xing, Z.; Lv, Y.; Zhang, S.; Zhang, X. Sensitive Sandwich Immunoassay Based on Single Particle Mode Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Detection. *Talanta* **2010**, *83* (1), 48–54.
- (38) Hu, J.; Deng, D.; Liu, R.; Lv, Y. Single Nanoparticle Analysis by ICPMS: A Potential Tool for Bioassay. *J. Anal. At. Spectrom* **2018**, *33* (1), 57–67.
- (39) Huang, Z.; Li, Z.; Jiang, M.; Liu, R.; Lv, Y. Homogeneous Multiplex Immunoassay for One-Step Pancreatic Cancer Biomarker Evaluation. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (24), 16105–16112.
- (40) Xu, X.; Chen, J.; Li, B.; Tang, L.; Jiang, J. Single Particle ICP-MS-Based Absolute and Relative Quantification of E. Coli O157 16S rRNA Using Sandwich Hybridization Capture. *Analyst* **2019**, *144* (5), 1725–1730.
- (41) Zhang, S.; Han, G.; Xing, Z.; Zhang, S.; Zhang, X. Multiplex DNA Assay Based on Nanoparticle Probes by Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (7), 3541–3547.
- (42) Hare, D.; Doble, P.; Dawson, M.; Moritz, R. L.; Simpson, R. J.; Minett, R.; Grimm, R.; Spikmans, V. Metal Profiling of Human Serum Using SEC-ICP-MS. *Agilent ICP-MS Journal* **2006**, *27*, 2–3.
- (43) Koplík, R.; Borková, M.; Mestek, O.; Komínková, J.; Suchánek, M. Application of Size-Exclusion Chromatography–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Fractionation of Element Species in Seeds of Legumes. *J. Chromatogr. B* **2002**, *775* (2), 179–187.
- (44) Sanchez, L. F.; Szpunar, J. Speciation Analysis for Iodine in Milk by Size-Exclusion Chromatography with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Detection (SEC-ICP MS). *J. Anal. At. Spectrom* **1999**, *14* (11), 1697–1702.
- (45) Luo, Y.; Ronk, M.; Joubert, M. K.; Semin, D.; Nashed-Samuel, Y. Determination of Interactions between Antibody Biotherapeutics and Copper by Size Exclusion Chromatography (SEC) Coupled with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP/MS). *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1079*, 252–259.
- (46) Whitty-Léveillé, L.; VanAernum, Z. L.; Pavon, J. A.; Murphy, C.; Neal, K.; Forest, W.; Gao, X.; Zhong, W.; Richardson, D. D.; Schuessler, H. A. Determination of Ultra-Trace Metal-Protein Interactions in Co-Formulated Monoclonal Antibody Drug Product by SEC-ICP-MS. *mAbs* **2023**, *15* (1), 2199466.
- (47) Terenghi, M.; Elviri, L.; Careri, M.; Mangia, A.; Lobinski, R. Multiplexed Determination of Protein Biomarkers Using Metal-Tagged Antibodies and Size Exclusion

- Chromatography–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (22), 9440–9448.
- (48) López-Fernández, L.; Blanco-González, E.; Bettmer, J. Determination of Specific DNA Sequences and Their Hybridisation Processes by Elemental Labelling Followed by SEC-ICP-MS Detection. *Analyst* **2014**, *139* (13), 3423–3428.
- (49) Li, S. F. Y. *Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications*; Elsevier, 1992.
- (50) Timerbaev, A. R. Element Speciation Analysis Using Capillary Electrophoresis: Twenty Years of Development and Applications. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (1), 778–812.
- (51) Álvarez-Llamas, G.; Fernández de laCampa, M. del R.; Sanz-Medel, A. ICP-MS for Specific Detection in Capillary Electrophoresis. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2005**, *24* (1), 28–36.
- (52) He, Y.; Mo, F.; Chen, D.; Xu, L.; Wu, Y.; Fu, F. Capillary Electrophoresis Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Combined with Metal Tag for Ultrasensitively Determining Trace Saxitoxin in Seafood. *Electrophoresis* **2017**, *38* (3–4), 469–476.
- (53) Yang, M.; Wu, W.; Ruan, Y.; Huang, L.; Wu, Z.; Cai, Y.; Fu, F. Ultra-Sensitive Quantification of Lysozyme Based on Element Chelate Labeling and Capillary Electrophoresis–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *812*, 12–17.
- (54) Orellana, F. A.; Gálvez, C. G.; Orellana, F. A.; Gálvez, C. G.; Roldán, M. T.; García-Ruiz, C.; Roldán, M. T.; García-Ruiz, C. Applications of Laser-Ablation-Inductively-Coupled Plasma-Mass Spectrometry in Chemical Analysis of Forensic Evidence. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2013**, *42*, 1–34.
- (55) Mokgalaka, N. S.; Gardea-Torresdey, J. L. Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Principles and Applications. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2006**, *41* (2), 131–150.
- (56) Liu, Y.; Hu, Z.; Li, M.; Gao, S. Applications of LA-ICP-MS in the Elemental Analyses of Geological Samples. *Chin. Sci. Bull.* **2013**, *58* (32), 3863–3878.
- (57) Doble, P. A.; de Vega, R. G.; Bishop, D. P.; Hare, D. J.; Clases, D. Laser Ablation–Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry Imaging in Biology. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (19), 11769–11822.
- (58) LaBine, G. O.; Molloy, P. P.; Christensen, J. R. Determination of Elemental Composition in Soft Biological Tissue Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Method Validation. *Appl Spectrosc* **2021**, *75* (10), 1262–1277.

- (59) Braeuer, S.; Van Helden, T.; Van Acker, T.; Leroux, O.; Van Der Straeten, D.; Verbeken, A.; Borovička, J.; Vanhaecke, F. Quantitative Mapping of Mercury and Selenium in Mushroom Fruit Bodies with Laser Ablation–Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2022**, *414* (25), 7517–7530.
- (60) Laurence, L.; Marc, D. Immunoanalyse et Toxicologie. *Annales de Toxicologie Analytique* **2009**, *21*(1), 1–2.
- (61) Yalow, R. S.; Berson, S. A. Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. *Nature* **1959**, *184* (4699), 1648–1649.
- (62) Zhang, C.; Wu, F.; Zhang, Y.; Wang, X.; Zhang, X. A Novel Combination of Immunoreaction and ICP-MS as a Hyphenated Technique for the Determination of Thyroid-Stimulating Hormone (TSH) in Human Serum. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2001**, *16* (12), 1393–1396.
- (63) Torregrosa, D.; Grindlay, G.; Gras, L.; Mora, J. Immunoassays Based on Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Detection: So Far so Good, so What? *Microchem. J.* **2021**, *166*, 106200.
- (64) Xu, S.; Liu, H.; Bai, Y. Highly Sensitive and Multiplexed Mass Spectrometric Immunoassay Techniques and Clinical Applications. *Anal Bioanal Chem* **2022**, *414* (18), 5121–5138.
- (65) Valera, E.; Babington, R.; Broto, M.; Petanas, S.; Galve, R.; Marco, M.-P. Chapter 7 - Application of Bioassays/Biosensors for the Analysis of Pharmaceuticals in Environmental Samples. In *Comprehensive Analytical Chemistry*; Petrovic, M., Barcelo, D., Pérez, S., Eds.; Analysis, Removal, Effects and Risk of Pharmaceuticals in the Water Cycle; Elsevier, 2013; Vol. 62, pp 195–229.
- (66) Dinis-Oliveira, R. J. Heterogeneous and Homogeneous Immunoassays for Drug Analysis. *Bioanalysis* **2014**, *6* (21), 2877–2896.
- (67) Sajid, M.; Kawde, A.-N.; Daud, M. Designs, Formats and Applications of Lateral Flow Assay: A Literature Review. *J. Saudi Chem. Soc.* **2015**, *19* (6), 689–705.
- (68) Grzych, G. *Génétique*, 1ere ed.; De Boeck Supérieur, 2017.
- (69) Neidle, S.; Sanderson, M. *Principles of Nucleic Acid Structure*, 2nd ed.; Academic Press, 2021.
- (70) BioPharmaSpec. *Oligonucleotide Definition*. <https://biopharmaspec.com/> (accessed 2023-03-29).

- (71) Liu, R.; Zhang, S.; Wei, C.; Xing, Z.; Zhang, S.; Zhang, X. Metal Stable Isotope Tagging: Renaissance of Radioimmunoassay for Multiplex and Absolute Quantification of Biomolecules. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49* (5), 775–783.
- (72) Siethoff, C.; Feldmann, I.; Jakubowski, N.; Linscheid, M. Quantitative Determination of DNA Adducts Using Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/High-Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34* (4), 421–426.
- (73) Brüchert, W.; Bettmer, J. DNA Quantification Approach by GE-ICP-SFMS and Complementary Total Phosphorus Determination by ICP-SFMS. *J. Anal. At. Spectrom.* **2006**, *21* (11), 1271–1276.
- (74) Leclerc, O.; Fraisse, P.-O.; Labarraque, G.; Oster, C.; Pichaut, J.-P.; Baume, M.; Jarraud, S.; Fiscaro, P.; Vaslin-Reimann, S. Method Development for Genomic Legionella Pneumophila DNA Quantification by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **2013**, *435* (2), 153–158.
- (75) de Bang, T. C.; Husted, S. Lanthanide Elements as Labels for Multiplexed and Targeted Analysis of Proteins, DNA and RNA Using Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2015**, *72*, 45–52.
- (76) Lores-Padín, A.; Menero-Valdés, P.; Fernández, B.; Pereiro, R. Nanoparticles as Labels of Specific-Recognition Reactions for the Determination of Biomolecules by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1128*, 251–268.
- (77) Luo, Y.; Yan, X.; Huang, Y.; Wen, R.; Li, Z.; Yang, L.; Yang, C. J.; Wang, Q. ICP-MS-Based Multiplex and Ultrasensitive Assay of Viruses with Lanthanide-Coded Biospecific Tagging and Amplification Strategies. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (20), 9428–9432.
- (78) Han, G.; Zhang, S.; Xing, Z.; Zhang, X. Absolute and Relative Quantification of Multiplex DNA Assays Based on an Elemental Labeling Strategy. *Angew. Chem.* **2013**, *125* (5), 1506–1511.
- (79) Brückner, K.; Schwarz, K.; Beck, S.; Linscheid, M. W. DNA Quantification via ICP-MS Using Lanthanide-Labeled Probes and Ligation-Mediated Amplification. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (1), 585–591.
- (80) Yin, X.; Chen, B.; He, M.; Hu, B. A Multifunctional Platform for the Capture, Release, And Enumeration of Circulating Tumor Cells Based on Aptamer Binding, Nicking Endonuclease-Assisted Amplification, And Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Detection. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (15), 10308–10315.

- (81) Lou, X.; Zhang, G.; Herrera, I.; Kinach, R.; Ornatsky, O.; Baranov, V.; Nitz, M.; Winnik, M. A. Polymer-Based Elemental Tags for Sensitive Bioassays. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (32), 6111–6114.
- (82) Liu, J.-M.; Li, Y.; Jiang, Y.; Yan, X.-P. Gold Nanoparticles Amplified Ultrasensitive Quantification of Human Urinary Protein by Capillary Electrophoresis with On-Line Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopic Detection. *J. Proteome Res.* **2010**, *9* (7), 3545–3550.
- (83) Zhao, Q.; Lu, X.; Yuan, C.-G.; Li, X.-F.; Le, X. C. Aptamer-Linked Assay for Thrombin Using Gold Nanoparticle Amplification and Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry Detection. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (17), 7484–7489.
- (84) Hsu, I.-H.; Chen, W.-H.; Wu, T.-K.; Sun, Y.-C. Gold Nanoparticle-Based Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Amplification and Magnetic Separation for the Sensitive Detection of a Virus-Specific RNA Sequence. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (14), 1795–1801.
- (85) Liu, J.-M.; Yan, X.-P. Ultrasensitive, Selective and Simultaneous Detection of Cytochrome c and Insulin Based on Immunoassay and Aptamer-Based Bioassay in Combination with Au/Ag Nanoparticle Tagging and ICP-MS Detection. *J. Anal. At. Spectrom* **2011**, *26* (6), 1191–1197.
- (86) Xu, Y.; Chen, B.; He, M.; Hu, B. A Homogeneous Nucleic Acid Assay for Simultaneous Detection of SARS-CoV-2 and Influenza A (H3N2) by Single-Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1186*, 339134.
- (87) He, Y.; Chen, S.; Huang, L.; Wang, Z.; Wu, Y.; Fu, F. Combination of Magnetic-Beads-Based Multiple Metal Nanoparticles Labeling with Hybridization Chain Reaction Amplification for Simultaneous Detection of Multiple Cancer Cells with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (1), 1171–1177.
- (88) Zhang, F.; Yong, L.; Hua, X.; You, F.; Wang, B.; Feng, Y.-L.; Mao, L. Noble-Metal Nanoparticle Labelling Multiplex miRNAs by ICP-MS Readout with Internal Standard Isotopes of ¹¹⁵In and ²⁰⁹Bi. *Analyst* **2021**, *146* (6), 2074–2082.
- (89) Liu, R.; Wang, C.; Xu, Y.; Hu, J.; Deng, D.; Lv, Y. Label-Free DNA Assay by Metal Stable Isotope Detection. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (24), 13269–13274.
- (90) Zhu, Y.-L.; Lian, Y.-M.; Wang, J.-K.; Chen, Z.-P.; Yu, R.-Q. Highly Sensitive and Specific Mass Spectrometric Platform for miRNA Detection Based on the Multiple-Metal-Nanoparticle Tagging Strategy. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (14), 5839–5848.

- (91) Li, Z.; Chen, X.; Huang, Z.; Zhou, J.; Liu, R.; Lv, Y. Multiplex Nucleic Acid Assay of SARS-CoV-2 via a Lanthanide Nanoparticle-Tagging Strategy. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (37), 12714–12722.
- (92) Liu, X.; Zhang, S.-Q.; Cheng, Z.-H.; Wei, X.; Yang, T.; Yu, Y.-L.; Chen, M.-L.; Wang, J.-H. Highly Sensitive Detection of MicroRNA-21 with ICPMS via Hybridization Accumulation of Upconversion Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (20), 12116–12122.
- (93) Zhang, X.-W.; Liu, M.-X.; He, M.-Q.; Chen, S.; Yu, Y.-L.; Wang, J.-H. Integral Multielement Signals by DNA-Programmed UCNP–AuNP Nanosatellite Assemblies for Ultrasensitive ICP–MS Detection of Exosomal Proteins and Cancer Identification. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (16), 6437–6445.
- (94) Jiang, D.; Huang, C.; Shao, L.; Wang, X.; Jiao, Y.; Li, W.; Chen, J.; Xu, X. Magneto-Controlled Aptasensor for Simultaneous Detection of Ochratoxin A and Fumonisin B1 Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with Multiple Metal Nanoparticles as Element Labels. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1127*, 182–189.
- (95) Liu, R.; Zhai, J.; Liu, L.; Wang, Y.; Wei, Y.; Jiang, X.; Gao, L.; Zhu, H.; Zhao, Y.; Chai, Z.; Gao, X. Spatially Marking and Quantitatively Counting Membrane Immunoglobulin M in Live Cells via Ag Cluster–Aptamer Probes. *Chem. Comm.* **2014**, *50* (27), 3560–3563.
- (96) Xu, Y.; Kang, Q.; Yang, B.; Chen, B.; He, M.; Hu, B. A Nanoprobe Based on Molybdenum Disulfide Nanosheets and Silver Nanoclusters for Imaging and Quantification of Intracellular Adenosine Triphosphate. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1134*, 75–83.
- (97) Larraga-Urdaz, A. L.; Sanchez, M. L. F.; Encinar, J. R.; Costa-Fernandez, J. M. Signal Amplification Strategies for Clinical Biomarker Quantification Using Elemental Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2022**, *414* (1), 53–62.
- (98) Li, Y.; Sun, S.; Yang, J.; Jiang, Y. Label-Free DNA Hybridization Detection and Single Base-Mismatch Discrimination Using CE-ICP-MS Assay. *Analyst* **2011**, *136* (23), 5038–5045.
- (99) de Bang, T. C.; Shah, P.; Cho, S. K.; Yang, S. W.; Husted, S. Multiplexed microRNA Detection Using Lanthanide-Labeled DNA Probes and Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (14), 6823–6826.
- (100) Zhang, Y.; Sun, G.; Hu, Z.; Xing, Z.; Zhang, S.; Zhang, X. A Multiplex Bacterial Assay Using an Element-Labeled Strategy for 16S rRNA Detection. *Analyst* **2020**, *145* (21), 6821–6825.

- (101) Wang, X.; Jin, L.; Guo, W.; Huang, L.; Hu*, S. Detection of Shigella Flexneri DNA by ICP-MS Based on Oligonucleotide Hybridization and Labeling of Gold Nanoparticles. *At. Spectrosc.* **2020**, *38* (3), 44–50.
- (102) Laitinen, O. H.; Hytönen, V. P.; Nordlund, H. R.; Kulomaa, M. S. Genetically Engineered Avidins and Streptavidins. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63* (24), 2992–3017.
- (103) Mokany, E.; Bone, S. M.; Young, P. E.; Doan, T. B.; Todd, A. V. MNAszymes, a Versatile New Class of Nucleic Acid Enzymes That Can Function as Biosensors and Molecular Switches. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (3), 1051–1059.
- (104) He, Y.; Chen, D.; Li, M.; Fang, L.; Yang, W.; Xu, L.; Fu, F. Rolling Circle Amplification Combined with Gold Nanoparticles-Tag for Ultra Sensitive and Specific Quantification of DNA by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *58*, 209–213.
- (105) Deng, C.; Zhang, C.-H.; Tang, H.; Jiang, J.-H. ICP-MS DNA Assay Based on Lanthanide Labels and Hybridization Chain Reaction Amplification. *Anal. Methods* **2015**, *7* (14), 5767–5771.
- (106) Li, X.-M.; Luo, J.; Zhang, N.-B.; Wei, Q.-L. Nucleic Acid Quantification Using Nicking–Displacement, Rolling Circle Amplification and Bio-Bar-Code Mediated Triple-Amplification. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *881*, 117–123.
- (107) Zhang, S.; Liu, R.; Xing, Z.; Zhang, S.; Zhang, X. Multiplex miRNA Assay Using Lanthanide-Tagged Probes and the Duplex-Specific Nuclease Amplification Strategy. *Chem. Comm.* **2016**, *52* (99), 14310–14313.
- (108) Liu, Y.; Ding, Y.; Gao, Y.; Liu, R.; Hu, X.; Lv, Y. Enzyme-Free Amplified DNA Assay: Five Orders of Linearity Provided by Metal Stable Isotope Detection. *Chem. Comm.* **2018**, *54* (98), 13782–13785.
- (109) Xiao, G.; Chen, B.; He, M.; Li, X.; Hu, B. A Highly Sensitive Assay of DNA Based on Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Detection with Gold Nanoparticle Amplification and Isothermal Circular Strand-Displacement Polymerization Reaction. *Talanta* **2019**, *202*, 207–213.
- (110) Wang, C.; Liu, R.; Hu, J.; Lv, Y. Ratiometric DNA Walking Machine for Accurate and Amplified Bioassay. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25* (53), 12270–12274.
- (111) Li, B.-R.; Tang, H.; Yu, R.-Q.; Jiang, J.-H. Single-Nanoparticle ICPMS DNA Assay Based on Hybridization-Chain-Reaction-Mediated Spherical Nucleic Acid Assembly. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (3), 2379–2382.

- (112) Wu, N.; Wang, K.; Wang, Y.-T.; Chen, M.-L.; Chen, X.-W.; Yang, T.; Wang, J.-H. Three-Dimensional DNA Nanomachine Biosensor by Integrating DNA Walker and Rolling Machine Cascade Amplification for Ultrasensitive Detection of Cancer-Related Gene. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (16), 11111–11118.
- (113) Kang, Q.; He, M.; Chen, B.; Xiao, G.; Hu, B. MNzyme-Catalyzed Amplification Assay with Lanthanide Tags for the Simultaneous Detection of Multiple microRNAs by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (2), 737–744.
- (114) Yin, X.; Chen, B.; He, M.; Hu, B. A Homogeneous Multicomponent Nucleic Acid Enzyme Assay for Universal Nucleic Acid Detection by Single-Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (11), 4952–4959.
- (115) Chen, B.; Xiao, G.; He, M.; Hu, B. Elemental Mass Spectrometry and Fluorescence Dual-Mode Strategy for Ultrasensitive Label-Free Detection of HBV DNA. *Anal. Chem.* **2021**, *93* (27), 9454–9461.
- (116) Kang, Q.; He, M.; Chen, B.; Hu, B. Highly Integrated and One-Step Triggered Cascade DNA Walker Based on Entropy-Driven Catalytic and DNzyme Amplification. *Sens. Actuators B: Chem.* **2021**, *345*, 130370.
- (117) Liu, S.; Wu, J.; He, M.; Chen, B.; Kang, Q.; Xu, Y.; Yin, X.; Hu, B. DNA Tetrahedron-Based MNzyme for Sensitive Detection of microRNA with Elemental Tagging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (49), 59076–59084.
- (118) Shen, J.; Li, T.; Wang, M.; Yao, B. Isothermal and Enzyme-Free MicroRNA Assay Based on Catalytic Hairpin Assembly and Rare Earth Element Labeled Probes. *Sens. Actuators B: Chem.* **2022**, *357*, 131364.
- (119) Wang, Q.; Liu, L.; Chen, X.; Wang, T.; Zhou, H.; Huang, H.; Qing, L.; Luo, P. Noninvasive Prognosis of Postmyocardial Infarction Using Urinary miRNA Ultratrace Detection Based on Single-Target DNA-Functionalized AuNPs. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14* (3), 3633–3642.
- (120) Wang, C.; Song, H.; Zhao, X.; Liu, R.; Lv, Y. Multiplex DNA Walking Machines for Lung Cancer-Associated miRNAs. *Anal. Chem.* **2022**, *94* (3), 1787–1794.
- (121) Yin, X.; Chen, B.; He, M.; Hu, B. Agarose-Droplet-Based Digital LAMP Assay for Counting Virus DNA in Single-Particle ICP-MS. *Anal. Chem.* **2022**, *94* (17), 6582–6590.
- (122) Xu, Y.; Xiao, G.; Chen, B.; He, M.; Hu, B. Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry-Based Homogeneous Detection of HBV DNA with Rolling Circle Amplification-Induced Gold Nanoparticle Agglomeration. *Anal. Chem.* **2022**.

- (123) Kang, Q.; Chen, B.; He, M.; Hu, B. Simple Amplifier Coupled with a Lanthanide Labeling Strategy for Multiplexed and Specific Quantification of MicroRNAs. *Anal. Chem.* **2022**, *94* (37), 12934–12941.
- (124) Kang, Q.; Chen, B.; He, M.; Hu, B. A Renewable Platform Based on the Entropy-Driven Catalytic Amplification and Element Labeling Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for microRNA Analysis. *Anal. Chim. Acta* **2023**, *1254*, 341112.
- (125) Zhan, X.; Zhou, J.; Jiang, Y.; An, P.; Luo, B.; Lan, F.; Ying, B.; Wu, Y. DNA Tetrahedron-Based CRISPR Bioassay for Treble-Self-Amplified and Multiplex HPV-DNA Detection with Elemental Tagging. *Biosens. Bioelectron.* **2023**, *229*, 115229.
- (126) Dirks, R. M.; Pierce, N. A. Triggered Amplification by Hybridization Chain Reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101* (43), 15275–15278.
- (127) Monsur Ali, M.; Li, F.; Zhang, Z.; Zhang, K.; Kang, D.-K.; Ankrum, J.; Chris Le, X.; Zhao, W. Rolling Circle Amplification: A Versatile Tool for Chemical Biology, Materials Science and Medicine. *Chem Soc Rev* **2014**, *43* (10), 3324–3341.
- (128) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature* **1990**, *346* (6287), 818–822.
- (129) Tuerk, C.; Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science* **1990**, *249* (4968), 505–510.
- (130) Jayasena, S. D. Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clin. Chem.* **1999**, *45* (9), 1628–1650.
- (131) McKeague, M.; McConnell, E. M.; Cruz-Toledo, J.; Bernard, E. D.; Pach, A.; Mastronardi, E.; Zhang, X.; Beking, M.; Francis, T.; Giamberardino, A.; Cabecinha, A.; Ruscito, A.; Aranda-Rodriguez, R.; Dumontier, M.; DeRosa, M. C. Analysis of In Vitro Aptamer Selection Parameters. *J Mol Evol* **2015**, *81* (5), 150–161.
- (132) Zhou, J.; Battig, M. R.; Wang, Y. Aptamer-Based Molecular Recognition for Biosensor Development. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *398* (6), 2471–2480.
- (133) Gooch, J.; Daniel, B.; Parkin, M.; Frascione, N. Developing Aptasensors for Forensic Analysis. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2017**, *94*, 150–160.
- (134) Yu, H.; Alkhamis, O.; Canoura, J.; Liu, Y.; Xiao, Y. Advances and Challenges in Small-Molecule DNA Aptamer Isolation, Characterization, and Sensor Development. *Angew Chem Int Ed Engl* **2021**, *60* (31), 16800–16823.
- (135) Lyu, C.; Khan, I. M.; Wang, Z. Capture-SELEX for Aptamer Selection: A Short Review. *Talanta* **2021**, *229*, 122274.

- (136) Gu, H.; Duan, N.; Wu, S.; Hao, L.; Xia, Y.; Ma, X.; Wang, Z. Graphene Oxide-Assisted Non-Immobilized SELEX of Okadaic Acid Aptamer and the Analytical Application of Aptasensor. *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 21665.
- (137) Mosing, R. K.; Bowser, M. T. Isolating Aptamers Using Capillary Electrophoresis-SELEX (CE-SELEX). *Methods Mol Biol* **2009**, *535*, 33–43.
- (138) El-Aziz, T. M. A.; Ravelet, C.; Molgo, J.; Fiore, E.; Pale, S.; Amar, M.; Al-Khoury, S.; Dejeu, J.; Fadl, M.; Ronjat, M.; Taiwe, G. S.; Servent, D.; Peyrin, E.; De Waard, M. Efficient Functional Neutralization of Lethal Peptide Toxins in Vivo by Oligonucleotides. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 7202.
- (139) Lisi, S.; Fiore, E.; Scarano, S.; Pascale, E.; Boehman, Y.; Ducongé, F.; Chierici, S.; Minunni, M.; Peyrin, E.; Ravelet, C. Non-SELEX Isolation of DNA Aptamers for the Homogeneous-Phase Fluorescence Anisotropy Sensing of Tau Proteins. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1038*, 173–181.
- (140) Kedzierski, S.; Caltagirone, T.; Khoshnejad, M. Synthetic Antibodies: The Emerging Field of Aptamers. *BioProcess J* **2013**, *11* (4), 46–49.
- (141) Walter, J.-G.; Heilkenbrinker, A.; Austerjost, J.; Timur, S.; Stahl, F.; Schepe, T. Aptasensors for Small Molecule Detection. *Z. Naturforsch. B* **2012**, *67* (10), 976–986.
- (142) Aydindogan, E.; Balaban, S.; Evran, S.; Coskunol, H.; Timur, S. A Bottom-Up Approach for Developing Aptasensors for Abused Drugs: Biosensors in Forensics. *Biosensors* **2019**, *9* (4), 118.
- (143) Keefe, A. D.; Pai, S.; Ellington, A. Aptamers as Therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9* (7), 537–550.
- (144) Song, S.; Wang, L.; Li, J.; Fan, C.; Zhao, J. Aptamer-Based Biosensors. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2008**, *27* (2), 108–117.
- (145) Liu, L. S.; Wang, F.; Ge, Y.; Lo, P. K. Recent Developments in Aptasensors for Diagnostic Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (8), 9329–9358.
- (146) Liu, L.; Zhao, Q. A Simple Fluorescence Anisotropy Assay for Detection of Bisphenol A Using Fluorescently Labeled Aptamer. *J. Environ. Sci.* **2020**, *97*, 19–24.
- (147) Soheili, V.; Taghdisi, S. M.; Abnous, K.; Ebrahimi, M. Point-of-Care Detection of Escherichia Coli O157:H7 in Water Using AuNPs-Based Aptasensor. *Iran J Basic Med Sci* **2020**, *23* (7), 901–908.
- (148) Jia, Y.; Zhou, G.; Liu, P.; Li, Z.; Yu, B. Recent Development of Aptamer Sensors for the Quantification of Aflatoxin B1. *Appl. Sci.* **2019**, *9* (11), 2364.

- (149) Tang, J.; Yu, T.; Guo, L.; Xie, J.; Shao, N.; He, Z. In Vitro Selection of DNA Aptamer against Abrin Toxin and Aptamer-Based Abrin Direct Detection. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22* (11), 2456–2463.
- (150) El-Aziz, T. M. A.; Ravelet, C.; Molgo, J.; Fiore, E.; Pale, S.; Amar, M.; Al-Khoury, S.; Dejeu, J.; Fadl, M.; Ronjat, M.; Taiwe, G. S.; Servent, D.; Peyrin, E.; De Waard, M. Efficient Functional Neutralization of Lethal Peptide Toxins in Vivo by Oligonucleotides. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 7202.
- (151) Yang, W.; Xi, Z.; Zeng, X.; Fang, L.; Jiang, W.; Wu, Y.; Xu, L.; Fu, F. Magnetic Bead-Based AuNP Labelling Combined with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Sensitively and Specifically Counting Cancer Cells. *J. Anal. At. Spectrom* **2016**, *31* (3), 679–685.
- (152) Zhang, X.; Chen, B.; He, M.; Wang, H.; Hu, B. Gold Nanoparticles Labeling with Hybridization Chain Reaction Amplification Strategy for the Sensitive Detection of HepG2 Cells by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *86*, 736–740.
- (153) Yang, B.; Chen, B.; He, M.; Yin, X.; Xu, C.; Hu, B. Aptamer-Based Dual-Functional Probe for Rapid and Specific Counting and Imaging of MCF-7 Cells. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (3), 2355–2361.
- (154) Xing, Y.; Han, J.; Wu, X.; T. Pierce, D.; Xiaojun Zhao, J. Graphene/Gold Nanoparticle Composites for Ultrasensitive and Versatile Biomarker Assay Using Single-Particle Inductively-Coupled Plasma/Mass Spectrometry. *Analyst* **2020**, *145* (24), 7932–7940.
- (155) Zhang, X.; Wei, X.; Men, X.; Wu, C.-X.; Bai, J.-J.; Li, W.-T.; Yang, T.; Chen, M.-L.; Wang, J.-H. Dual-Multivalent-Aptamer-Conjugated Nanoprobes for Superefficient Discerning of Single Circulating Tumor Cells in a Microfluidic Chip with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (36), 43668–43675.
- (156) Yao, S.; Pang, B.; Fu, Y.; Song, X.; Xu, K.; Li, J.; Wang, J.; Zhao, C. Multiplex Detection of Foodborne Pathogens Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Magnetic Separation and Metal Nanoclusters-Mediated Signal Amplification. *Sens. Actuators B: Chem.* **2022**, *359*, 131581.
- (157) Zhu, Y.-L.; Wang, J.-K.; Chen, Z.-P.; Zhao, Y.-J.; Yu, R.-Q. Ultrasensitive Detection of Multiple Cancer Biomarkers by a Triple Cascade Amplification Strategy in Combination with Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Microchim Acta* **2022**, *190* (1), 20.

- (158) Zhang, J.; Lu, Y.; Gao, W.; Yang, P.; Cheng, N.; Jin, Y.; Chen, J. Structure-Switching Locked Hairpin Triggered Rolling Circle Amplification for Ochratoxin A (OTA) Detection by ICP-MS. *Microchem. J.* **2023**, *186*, 108365.
- (159) Torregrosa, D.; Jauset-Rubio, M.; Serrano, R.; Svobodová, M.; Grindlay, G.; O'Sullivan, C. K.; Mora, J. Ultrasensitive Determination of β -Conglutin Food Allergen by Means an Aptamer Assay Based on Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Detection. *Anal. Chim. Acta* **2023**, *1252*, 341042.
- (160) Ruscito, A.; DeRosa, M. C. Small-Molecule Binding Aptamers: Selection Strategies, Characterization, and Applications. *Front Chem* **2016**, *4*, 14.
- (161) Xu, L.; Liang, H.-W.; Yang, Y.; Yu, S.-H. Stability and Reactivity: Positive and Negative Aspects for Nanoparticle Processing. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (7), 3209–3250.
- (162) Baer, D. R. The Chameleon Effect: Characterization Challenges Due to the Variability of Nanoparticles and Their Surfaces. *Front. Chem.* **2018**, *6*.
- (163) Urmann, K.; Modrejowski, J.; Scheper, T.; Walter, J.-G. Aptamer-Modified Nanomaterials: Principles and Applications. *BioNanoMaterials* **2017**, *18* (1–2).
- (164) Kazakov, S. A. Nucleic Acid Binding and Catalysis by Metal Ions. In *Bioorganic Chemistry. Part I: Nucleic Acids.*; Hecht, S.M.: Oxford University Press, New York-Oxford, 1996; pp 244–287 ; 467–476.
- (165) Alonso-García, F. J.; Blanco-González, E.; Montes-Bayón, M. An Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) Linked Immunoassay by Means of Iodinated Antibodies for Transferrin Quantitative Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Talanta* **2019**, *194*, 336–342.
- (166) Roos, P. H.; Venkatachalam, A.; Manz, A.; Waentig, L.; Koehler, C. U.; Jakubowski, N. Detection of Electrophoretically Separated Cytochromes P450 by Element-Labelled Monoclonal Antibodies via Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2008**, *392* (6), 1135–1147.
- (167) Li, J.; Wang, X.; Zhuang, Z.; Cui, W. Nonradioactive Iodine-Labeled Antibodies-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Immunoassay. *Spectrosc. Spect. Anal.* **2010**, *30* (3), 788–791.
- (168) Jakubowski, N.; Messerschmidt, J.; Garijo Añorbe, M.; Waentig, L.; Hayen, H.; H. Roos, P. Labelling of Proteins by Use of Iodination and Detection by ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom* **2008**, *23* (11), 1487–1496.

- (169) Pereira Navaza, A.; Encinar, J. R.; Ballesteros, A.; González, J. M.; Sanz-Medel, A. Capillary HPLC–ICPMS and Tyrosine Iodination for the Absolute Quantification of Peptides Using Generic Standards. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (13), 5390–5399.
- (170) Gao, Y.; Xu, D.; Li, H.; Yang, X.; Wang, M.; Gao, Q. A Method for Determining the Content of Glycoproteins in Biological Samples. *Molecules* **2016**, *21* (12), 1625.
- (171) *L-Thyroxine - T2376*. <http://www.sigmaaldrich.com/> (accessed 2023-04-20).
- (172) *Thyroxine (BSA - Conjugated) (OOC00147)*. <https://www.avivasysbio.com/thyroxine-bsa-conjugated-oocd00147.html> (accessed 2023-04-20).
- (173) Li, Y.; Sun, L.; Zhao, Q. Aptamer-Structure Switch Coupled with Horseradish Peroxidase Labeling on a Microplate for the Sensitive Detection of Small Molecules. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (4), 2615–2619.
- (174) Chovelon, B.; Durand, G.; Dausse, E.; Toulmé, J.-J.; Faure, P.; Peyrin, E.; Ravelet, C. ELAKCA: Enzyme-Linked Aptamer Kissing Complex Assay as a Small Molecule Sensing Platform. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (5), 2570–2575.
- (175) Perrier, S.; Bouilloud, P.; De Oliveira Coelho, G.; Henry, M.; Peyrin, E. Small Molecule Aptamer Assays Based on Fluorescence Anisotropy Signal-Enhancer Oligonucleotides. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *82*, 155–161.
- (176) Ruta, J.; Perrier, S.; Ravelet, C.; Fize, J.; Peyrin, E. Noncompetitive Fluorescence Polarization Aptamer-Based Assay for Small Molecule Detection. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (17), 7468–7473.
- (177) Zhu, Z.; Schmidt, T.; Mahrous, M.; Guieu, V.; Perrier, S.; Ravelet, C.; Peyrin, E. Optimization of the Structure-Switching Aptamer-Based Fluorescence Polarization Assay for the Sensitive Tyrosinamide Sensing. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *707* (1–2), 191–196.
- (178) Billet, B.; Chovelon, B.; Fiore, E.; Oukacine, F.; Petrillo, M.-A.; Faure, P.; Ravelet, C.; Peyrin, E. Aptamer Switches Regulated by Post-Transition/Transition Metal Ions. *Angew. Chem.* **2021**, *133* (22), 12454–12458.
- (179) Tan, Z.; Feagin, T. A.; Heemstra, J. M. Temporal Control of Aptamer Biosensors Using Covalent Self-Caging To Shift Equilibrium. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (20), 6328–6331.
- (180) Osypova, A.; Thakar, D.; Dejeu, J.; Bonnet, H.; Van der Heyden, A.; Dubacheva, G. V.; Richter, R. P.; Defrancq, E.; Spinelli, N.; Coche-Guérente, L.; Labbé, P. Sensor Based on Aptamer Folding to Detect Low-Molecular Weight Analytes. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (15), 7566–7574.

- (181) Challier, L.; Mavré, F.; Moreau, J.; Fave, C.; Schöllhorn, B.; Marchal, D.; Peyrin, E.; Noël, V.; Limoges, B. Simple and Highly Enantioselective Electrochemical Aptamer-Based Binding Assay for Trace Detection of Chiral Compounds. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (12), 5415–5420.
- (182) Merino, E. J.; Weeks, K. M. Facile Conversion of Aptamers into Sensors Using a 2'-Ribose-Linked Fluorophore. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (37), 12766–12767.
- (183) Challier, L.; Miranda-Castro, R.; Barbe, B.; Fave, C.; Limoges, B.; Peyrin, E.; Ravelet, C.; Fiore, E.; Labbé, P.; Coche-Guérente, L.; Ennifar, E.; Bec, G.; Dumas, P.; Mavré, F.; Noël, V. Multianalytical Study of the Binding between a Small Chiral Molecule and a DNA Aptamer: Evidence for Asymmetric Steric Effect upon 3'- versus 5'-End Sequence Modification. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (23), 11963–11971.
- (184) Xie, Y.; Ning, M.; Ban, J.; Li, Q. Novel Enzyme-Linked Aptamer Assay for the Determination of Aflatoxin B1 in Peanuts. *Anal. Lett.* **2019**, *52* (18), 2961–2973.
- (185) Daniel, C.; Mélaïne, F.; Roupioz, Y.; Livache, T.; Buhot, A. Real Time Monitoring of Thrombin Interactions with Its Aptamers: Insights into the Sandwich Complex Formation. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *40* (1), 186–192.
- (186) Lin, P.-H.; Chen, R.-H.; Lee, C.-H.; Chang, Y.; Chen, C.-S.; Chen, W.-Y. Studies of the Binding Mechanism between Aptamers and Thrombin by Circular Dichroism, Surface Plasmon Resonance and Isothermal Titration Calorimetry. *Colloids Surf. B.* **2011**, *88* (2), 552–558.
- (187) Kitamoto, Y.; Tomita, K.; Imamura, T. Assessment of Thrombin in the Urine of Glomerulonephritic Patients by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Ann Clin Biochem* **2004**, *41* (2), 133–137.
- (188) Parker, A. J.; Stewart, J.; Donald, K. J.; Parish, C. A. Halogen Bonding in DNA Base Pairs. *J Am Chem Soc* **2012**, *134* (11), 5165–5172.
- (189) Kolář, M. H.; Tabarrini, O. Halogen Bonding in Nucleic Acid Complexes. *J Med Chem* **2017**, *60* (21), 8681–8690.
- (190) Billet, B.; Chovelon, B.; McConnell, E. M.; André, D.; Puillet-Anselme, L.; Fiore, E.; Faure, P.; Ravelet, C.; DeRosa, M. C.; Peyrin, E. Iodinated Organic Molecule as Tag for Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry Aptamer Assays. *Talanta* **2024**, *267*, 125107.

Serment de Galien

*Faculté de Pharmacie,
Université Grenoble Alpes*



Serment de Galien



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



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.



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 ».

Mme Blandine BILLET

LES APTAMÈRES AU SERVICE DU DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE :
DÉVELOPPEMENT D'UN ESSAI AVEC DÉTECTION PAR ICP-MS.

Résumé

La spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) est une technique puissante pour l'analyse des éléments traces. Son utilisation comme méthode de révélation du signal dans des essais employant des marqueurs élémentaires permet d'obtenir de faibles limites de détection ainsi qu'une sensibilité élevée. Au-delà des immunodosages traditionnellement retrouvés, un certain nombre d'essais utilisant des oligonucléotides ou des aptamères comme agents de reconnaissance ont été développés, et on fait l'objet d'une revue de la littérature dans la première partie de ce manuscrit. Les aptamères sont des oligonucléotides synthétiques monocaténares qui présentent une grande affinité ainsi qu'une spécificité élevée envers une cible précise. Souvent considérés comme des « anticorps synthétiques », ceux-ci présentent de nombreux atouts par rapport à ces derniers, aussi bien sur le processus de synthèse qu'au niveau de leurs propriétés physico-chimiques, ainsi que sur le plan éthique.

Les marqueurs élémentaires couramment employés, à savoir les nanoparticules métalliques et les chélates de lanthanides, offrent respectivement une amplification significative du signal et un dosage aisé avec un faible bruit de fond. Ces derniers possèdent néanmoins certaines limites au niveau de leurs conditions de synthèse et de manipulation. La seconde partie de ce manuscrit est consacrée au développement d'une preuve de concept utilisant un marqueur organique non métallique, la L-thyroxine, comprenant 4 atomes d'iode détectables par ICP-MS. Notre méthode, opérant en phase hétérogène, est basée sur un dosage par compétition pour la détection d'une petite molécule (L-tyrosinamide), ou sur une technique dite « sandwich » pour la détection d'une protéine (thrombine). La conception générale implique l'utilisation d'un aptamère marqué à son extrémité par une molécule de L-thyroxine, ainsi que d'un agent de capture immobilisé sur une microplaque, étant soit une séquence d'ADN complémentaire, soit un second aptamère.

Plusieurs paramètres expérimentaux tels que la longueur du brin complémentaire, les conditions de récupération de l'échantillon, la concentration en aptamère ainsi que les conditions d'incubation du complexe aptamère-cible, ont été explorés. En conditions optimales, des limites de détection de l'ordre du nanomolaire (10^{-9} mol/L) ont été rapportées pour les deux analytes. En outre, l'applicabilité potentielle de cette stratégie en milieu biologique a été démontrée, avec une détection effective de la thrombine dans une matrice urinaire diluée.

Mots-clés : Aptamère, ICP-MS, essai, L-thyroxine, L-tyrosinamide, thrombine.

Spécialité : Internat de pharmacie : Innovation Pharmaceutique et Recherche.