

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTÉ DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2019 - 2020

N  29

THÈSE D'EXERCICE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

GAGNOL Thomas, n  le 19 juillet 1993

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 21 JUILLET 2020

CIBLAGE D'UN BIOMARQUEUR   L'AIDE D'UN APTAMÈRE :
CAS DU MARQUEUR TUMORAL DDR2 DANS LE MÉLANOME
MÉTASTATIQUE.

JURY

Président : M. CLASTRE Marc, Professeur, Université de Tours – TOURS

Membres :

M. AZEMA Laurent, Maitre de conférences, Université Bordeaux - BORDEAUX

Mme BERQUE BESTEL Isabelle, Pharmacien, Professeur, Université Bordeaux -
BORDEAUX

Mme DUCEUX Margot, Pharmacien, SH Consulting, TOURS

DIRECTEURS

Directeur universitaire : M. CLASTRE Marc.

Directeur industriel : M. AZEMA Laurent.

ANNEE : 2019 - 2020

Directrice : Pr Véronique MAUPOIL

Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS

Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN

ENSEIGNANTS

17 PROFESSEURS

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	PHARMACOGNOSIE
GIRAUDEAU	Bruno	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

2 PROFESSEURS EMERITES

AGAFONOV	Viatcheslav	CHIMIE PHYSIQUE
GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES

38 MAITRES DE CONFERENCES

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BOUDESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE

DELAYE
DENEVAULT
DOUZIECH-EYROLLES
DUMAS
GERMON
GLEVAREC
HERVE-AUBERT
JUSTE
LAJOIE
LANOUE
MARC
MARCHAIS
MAVEL
MUNNIER
OMBETTA-GOKA
OUDIN
PASQUALIN
PRIE
RESPAUD
SOUCE
TAUBER
VELGE-ROUSSEL
VERCOUILLIE
VERGOTE
VIERRON
ZHANG

Pierre-Olivier
Caroline
Laurence
Jean-François
Stéphanie
Gaëlle
Katel
Matthieu
Laurie
Arnaud
Jillian
Hervé
Sylvie
Emilie
Jean-Edouard
Audrey
Côme
Gildas
Renaud
Martin
Clovis
Florence
Johnny
Jackie
Emilie
Bei-Li

CHIMIE THERAPEUTIQUE
 CHIMIE THERAPEUTIQUE
 AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
 BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
 IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
 BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
 CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
 IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
 MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
 BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
 BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
 PHARMACIE GALENIQUE
 CHIMIE THERAPEUTIQUE
 PHARMACIE GALENIQUE
 CHIMIE ORGANIQUE
 BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
 PHARMACOLOGIE
 CHIMIE ORGANIQUE
 CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
 CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
 BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
 IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
 BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
 AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
 BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
 PHARMACOLOGIE

1 DIRECTEUR DE RECHERCHE

CHALON

Sylvie

INSERM

2 CHARGES DE RECHERCHE

MEVELEC
MOIRE

Marie-Noëlle
Nathalie

INRA
 INRA

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN

Susan

ANGLAIS

3 AHU

FOUCAULT
FOUCAULT-FRUCHARD
MARLET

Amélie
Laura
Julien

HEMATOLOGIE
 PHARMACIE CLINIQUE
 MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

4 ATER

BILLET
DRIOUCH
LAKHRIF
VERGES

Kevin
Abderrazzak
Zineb
Valentin

BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
 BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
 FORMATIONS BIO3 INSTITUTE
 BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;

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 Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;

De coopérer avec les autres professionnels de santé ;

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.

Date : Mardi 21 juillet 2020

L'étudiant

Monsieur GAGNOL Thomas



Le Doyen de la Faculté

Mme Véronique Maupoil

REMERCIEMENTS

Il n'est pas chose facile de remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, ou qui m'ont accompagné au cours de cette thèse, et au cours de mes études de manière générale, tellement elles sont nombreuses.

Je souhaiterais premièrement remercier mes deux directeurs de thèses.

Merci à Monsieur Marc Clastre, pour m'avoir initié à la recherche scientifique lors des différents stages au début de mon cursus, puis d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse ainsi que le Président de Jury.

Merci à Monsieur Laurent Azéma de m'avoir encadré au cours de mon stage de 6^e année, puis au cours de cette étape cruciale de la vie d'un pharmacien qu'est la thèse d'exercice.

Je remercie également Madame Isabelle Berque Bestel et Madame Margot Duceux, qui me font l'honneur d'être membre du jury de cette thèse, malgré les conditions inédites et particulières de cette période.

Enfin, je remercie tous les enseignants et les encadrants que j'ai pu rencontrer au cours de ma scolarité, pour les connaissances et les valeurs que chacun m'a apporté.

Je ne dirais jamais assez merci à mes parents pour leur accompagnement et leur soutien tout au long de ma vie et de mon parcours scolaire, qui m'ont permis d'en arriver où j'en suis aujourd'hui, grâce aux heures d'apprentissage, d'explications et toute l'aide qu'ils m'ont apporté.

Merci à ma sœur et mon frère pour les années de colocation et de chamailleries.

Merci également à tous les membres de ma famille, mes grands-parents, ma tante, mon oncle, mes cousins, mon parrain, ma marraine, pour les années d'encouragements, de soutien et de conseils.

Merci à Mathieu pour tous les moments passés à m'épauler, me remonter le moral et à supporter les crises de nerfs et d'angoisse sur ces derniers mois. Merci pour tout.

Après la famille, les copains de toujours et d'aujourd'hui.

Merci à Amandine et Pierrick d'être là depuis tellement longtemps que je ne compte plus les années.

Merci à Margot pour ces folles années de rires, de pleurs, de TP, et de vie à TCB.

Merci à Kaline pour la détente musicale, les cours de billard et le café.

Merci à Fanny d'avoir été le rayon de soleil de ma vie étudiante.

Merci à Maxime, pour m'avoir aidé à supporter Gomar et Nini en TP.

Merci à Marion pour sa patience face à mes questions, mes moments de paniques administratives, et pour les apéros-série.

Merci à Émilie pour les heures de révisions et les covoiturages karaoké.

Merci à Manon, Valton, Adrien, VLC, Marion, Charlotte, Mebarka, Patricia, Charon, Nono, Alex, et tous les copains tourangeaux, pour les galères comme les bons moments de la vie étudiante.

Merci à Marie, Mailys, Laura, Élise, Boudi, Arnaud, et tous les copains bordelais pour l'accueil que vous m'avez fait au cours de ces dernières années.

SOMMAIRE

LISTE ENSEIGNANTS	2
SERMENT DE GALIEN	4
REMERCIEMENTS	5
SOMMAIRE.....	7
TABLE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX.....	10
LEXIQUE	11
INTRODUCTION.....	13
MARQUEURS DU MELANOME & APTAMERES.....	15
PARTIE I – LE MELANOME METASTATIQUE	15
1) <i>Physiologie de la peau</i>	<i>15</i>
2) <i>Physiopathologie du mélanome</i>	<i>16</i>
3) <i>Facteurs de risque.....</i>	<i>18</i>
4) <i>Épidémiologie du mélanome.....</i>	<i>18</i>
5) <i>Du mélanome au mélanome métastatique</i>	<i>20</i>
6) <i>Diagnostic du mélanome métastatique</i>	<i>22</i>
7) <i>Thérapies actuelles du mélanome métastatique</i>	<i>23</i>
PARTIE II : MARQUEURS TUMORAUX D'INTERET : LES RECEPTEURS DDR.....	25
1) <i>Marqueur tumoral : définitions et intérêts.....</i>	<i>25</i>
2) <i>Les récepteurs à activité tyrosine kinase</i>	<i>26</i>
3) <i>Les récepteurs DDR.....</i>	<i>27</i>
4) <i>Ciblage d'un marqueur tumoral par un biosenseur</i>	<i>34</i>
PARTIE III : PROPRIETES ET METHODES DE SELECTION DES APTAMERES.....	35
1) <i>Définitions et mécanisme d'action.....</i>	<i>35</i>
2) <i>Applications des aptamères</i>	<i>38</i>
3) <i>Méthode de sélection par SELEX</i>	<i>42</i>
a. <i>Beads-SELEX</i>	<i>44</i>
b. <i>Filtration-SELEX.....</i>	<i>45</i>
c. <i>Cell-SELEX</i>	<i>46</i>
4) <i>Séquençage à Haut-Débit (HTS : High Throughput Sequencing) du SELEX</i>	<i>48</i>

EXPERIMENTATION : SELECTION D'APTAMERES DIRIGES CONTRE DDR2. 53

PARTIE I : MATERIELS ET METHODES	53
1) <i>Matériels et fournisseurs</i>	53
2) <i>Banques d'oligonucléotides et amorces de PCR</i>	54
3) <i>Protéine d'intérêt (DDR2) et protéine de contre sélection (DDR1 et GST)</i>	55
4) <i>Sélection par méthode de crossover-SELEX</i>	55
a. <i>Beads-SELEX</i>	56
b. <i>Filtration-SELEX</i>	57
c. <i>Cell-SELEX</i>	59
5) <i>Amplification des séquences par PCR</i>	60
6) <i>Préparation des séquences pour le tour suivant de SELEX</i>	61
7) <i>Identification des séquences candidates sélectionnées</i>	62
PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSIONS	64
1) <i>Bilan du SELEX dirigés contre DDR2</i>	64
2) <i>Séquences identifiées par méthode NGS</i>	70
3) <i>Perspectives pour la suite du SELEX dirigé contre DDR2</i>	73
DISCUSSION ET PERSPECTIVES : STATUT ACTUEL DES APTAMERES,	
PERSPECTIVES D'AMELIORATIONS ET FUTURES APPLICATIONS DANS LE	
DOMAINE PHARMACEUTIQUE.	81
CONCLUSION	94
BIBLIOGRAPHIE.....	96
ANNEXES	108
ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT.....	118
PAGE DE SIGNATURES.....	119

TABLE DES FIGURES

Figure 1 - Représentation de la structure de l'épiderme.....	16
Figure 2 - Schéma simplifié des voies de signalisation des MAPK et PI3K	17
Figure 3 - Évolution de l'incidence et du taux de mortalité du mélanome cutané de 1990 à 2012 (InCA)..	19
Figure 4 - Schéma des étapes de formation des métastases.	21
Figure 5 - Photographies de lésions cutanées	22
Figure 6 - Représentation schématisée des différents domaines d'un RTK	26
Figure 7 - Représentation schématisée de DDR1 et DDR2	27
Figure 8 – Alignement des séquences des domaines DS de DDR1 et DDR2	28
Figure 9 – Représentation du site de fixation du collagène dans le domaine DS de DDR2	29
Figure 10 - Cascade de signalisation intracellulaire initiée par les DDR décrite par Valiathan et al.	30
Figure 11 - Représentation schématisée du recrutement des MMP par DDR1 et DDR2	32
Figure 12 - Fonctions des DDR selon la localisation à la membrane cellulaire	33
Figure 13 - Contribution des récepteurs DDR dans le cancer	33
Figure 14 - Composition des nucléotides composant l'ADN et l'ARN.....	36
Figure 15 - Représentation schématisée de l'interaction d'un aptamère et d'un biomarqueur	37
Figure 16 - Riboswitch de l'ARNm codant impliqué dans la synthèse de thiamine	38
Figure 17 - Champs d'application possibles des aptamères en diagnostic et thérapie.....	39
Figure 18 - Comparaison des principes du test ELISA et du test ALISA	41
Figure 19 - Schéma des étapes d'un cycle de sélection par méthode SELEX dite « conventionnelle »	43
Figure 20 - Schéma d'un cycle de sélection par beads-SELEX	44
Figure 21 - Schéma d'un cycle de sélection par filtration-SELEX.....	45
Figure 22 - Schéma d'un cycle de sélection par cell-SELEX	46
Figure 23 - Clonage et séquençage Sanger	49
Figure 24 - Principe de séquençage par synthèse utilisé par la plateforme de séquençage Illumina®	51
Figure 25 - Apports des méthodes NGS pour la méthode SELEX.....	52
Figure 26 - Programme TouchDown utilisé pour l'amplification par PCR et exemple de gel de contrôle.	60
Figure 27 - Principe de séparation de brin sur gel par technique de l'amorce alourdie.....	61
Figure 28 - Programme « PCR NGS » d'amplification PCR des séquences analysées par NGS.....	63
Figure 29 - Alignement des séquences sélectionnées par SELEX	71
Figure 30 - Essai de liaison par détection de fluorescence	72
Figure 31 – Exemple de troncature de structure de la séquence D2.1.	75
Figure 32 – Workflow du développement d'un aptamère.	77
Figure 33 - Modifications chimiques apportées aux nucléotides.....	79
Figure 34 – Étapes de développement d'un aptamère.	80
Figure 35 - Représentation d'un cycle de Phage Display	84
Figure 36 - Différentes stratégies pour augmenter la diversité des acides nucléiques	86
Figure 37 - Exemple de nucléotides XNA	87
Figure 38 - Schéma explicatif de la technologie Spiegelmer®	88
Figure 39 - Représentation d'un cycle de SELEX par Particle Display	90
Figure 40 - Représentation d'un aptabeacon pour la détection de la protéine Tat du VIH	91
Figure 41 - Nanoparticules-aptamères pour la détection de cellules tumorales HER2+ et/ou MCU1+.....	92

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I - Fonctions de DDR1 et DDR2 chez la souris	31
Tableau II - Liste non-exhaustive d'aptamères en phase clinique	40
Tableau III - Tableau comparatif des trois méthodes de sélection SELEX	47
Tableau IV - Séquences de la banque initiale et amorces de PCR.....	54
Tableau V - Préparation du mix de PCR pour amplification des séquences du SELEX.	60
Tableau VI - Préparation du mix de PCR pour amplification en vue du séquençage.	62
Tableau VII - Conditions de sélection du cross-SELEX dirigés contre DDR2	68
Tableau VIII - Diversité des séquences issues du SELEX dirigés contre DDR2	70
Tableau IX - Analyse du séquençage : séquences candidates.....	71
Tableau X - Banques de séquences utilisées pour le doped-SELEX	74
Tableau XI - Essais biophysiques de caractérisation de l'interaction aptamère-cible.....	76
Tableau XII - Tableau comparatif des caractéristiques des aptamères et des anticorps.	82

LEXIQUE

Ac : Anticorps
 ADN : Acide Désoxyribonucléique
 AGEIS : Artificially Expanded Genetic Information System
 ALISA : Aptamer-Linked Immunosorbent Assay
 AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
 ARN : Acide Ribonucléique
 ARNm : Acide Ribonucléique messenger
 ARNt : Acide Ribonucléique de transfert
 CCL2 : Chemokine Ligand 2
 CTL-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
 ddNTP : didésoxyribonucléoside trisphosphate
 DDR : Discoidin-Domain Receptor
 DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge
 dNTP : désoxyribonucléoside trisphosphate
 ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
 ELONA : Enzymatic-Linked OligoNucleotide Assay
 ELOSA : Enzymatic-Linked OligoSorbent Assay
 FACS : Fluorescence Activated Cell-Sorting
 FvW : Facteur de Willebrand
 GST : Glutathion S-Transférase
 HNA : 5-anhydrohexitol Nucleic Acid
 HPLC : High-Performance Liquid Chromatographie
 HUVEC : Humann Umbilical Vein Endothelial Cell
 ICP : Inhibiteur de Check-Point
 IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
 ITC : Isothermal Titration Calorimetry
 K_D : Constante de dissociation
 kDa : kilo Dalton
 LNA : Locked Nucleic Acid
 MAPK : Mitogen-activated Protein Kinases
 MEC : Matrice Extra-Cellulaire
 MMP : Matrix MetalloProteinase

NGS : Next-Generation Sequencing
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PA : Personnes-Années
PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PEG : Poly-Ethylene Glycol
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
qPCR : PCR Quantitative
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RTK : Récepteur à activité Tyrosine Kinase
SBS : Sequencing by Synthesis
SELEX : Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
SOMAmer : Slow-Off rate Modified Aptamer
SPR : Surface Plasmon Resonance
TA : Température Ambiante
TEMP : Tomographie par Emission de Mono-Photon
TEP : Tomographie à Émission de Position
TFPI : Tissue Factor Pathway Inhibitor
TPP : Thiamine Pyrophosphate
TSM : Taux standardisé monde
UBP : Unnatural Base Pair
UV : Ultra-Violet
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
XNA : Xeno Nucleic Acid

INTRODUCTION

L'étude d'une pathologie et le suivi des patients reposent sur l'observation des changements et de l'évolution de marqueurs associés à un état clinique. Bien que le développement de ce concept remonte aux années 50, sous les termes de « biological markers » ou « biochemical markers », la première apparition du terme « biomarqueur » dans la littérature scientifique remonte à 1977, dans une étude de marqueur de tumeurs gynécologiques (« Tumor biomarkers of value in the management of gynecologic malignancy will also be correlated with clinical course » Order et al.) (1). Par la suite, l'étude des biomarqueurs est devenue un outil essentiel pour le suivi clinique, et son importance a notamment été démontrée concernant les patients séropositifs au VIH (2). En 1998, le 'National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group' définit le biomarqueur comme « une caractéristique objectivement mesurable et évaluable comme indicateur d'un processus physiologique, d'un processus pathologique ou d'une réponse pharmacologique à une thérapie » (3). L' 'International Program on Chemical Safety' (mené par l'OMS) complète par la suite la définition de biomarqueur comme « une substance, une structure ou un processus pouvant être mesurer directement dans l'organisme ou par prélèvement, et pouvant influencer ou prédire un taux d'incidence ou la survenue d'une pathologie » (4). Les biomarqueurs sont des outils essentiels pour le diagnostic médical, la détermination du stade évolutif d'une pathologie, l'évaluation du pronostic d'une maladie et le suivi de la réponse clinique à une intervention thérapeutique (3). L'étude des biomarqueurs est un enjeu majeur dans la recherche biomédicale et le développement de molécules thérapeutiques pour comprendre la relation entre les processus biologiques quantifiables par ces biomarqueurs et les signes cliniques associés, et élargir l'arsenal thérapeutique dans tous les types de pathologie (cancer, troubles cardiovasculaires, maladies auto-immunes) (5).

Une des stratégies d'étude des biomarqueurs est l'utilisation de biosenseurs. Initialement, un biosenseur est défini comme « un outil permettant de mesurer une réaction biologique ou chimique en générant un signal proportionnel à la concentration d'un analyte » (6). Au fur et à mesure des évolutions technologiques, leur nature s'est diversifiée et leur champ d'application est maintenant multidisciplinaire, notamment grâce à l'association des principes de sciences fondamentales (physique, chimie et biologie) et des nouvelles technologies (électroniques, micro et nanotechnologie). Les biosenseurs sont ainsi des outils de choix pour le ciblage *in vivo* des biomarqueurs et pour le diagnostic *in vitro* de pathologie. Leurs domaines d'applications ne sont pas restreints au domaine médical, mais s'étendent à tous ceux relevant de la santé publique telle que la qualité de l'eau, de la nourriture et de l'environnement (7).

L'objectif de cette thèse est de décrire le processus de développement d'une classe de biosenseurs : les aptamères. Le biomarqueur ciblé est un marqueur tumoral impliqué dans la migration et l'invasion de cellules tumorales du mélanome métastatique. Les aptamères issus du développement seront des candidats pour une utilisation en thérapie et en diagnostic de ce cancer, mais également un outil pour l'étude du biomarqueur.

Dans un premier temps, nous détaillerons la physiopathologie du mélanome métastatique, en abordant particulièrement le marqueur tumoral d'intérêt DDR2, et nous présenterons la technologie des aptamères, leur processus de sélection par SELEX et leurs applications dans le domaine médical. Puis, nous exposerons le processus de sélection d'aptamères par la méthode de crossover-SELEX, effectuée au cours de mon stage de Master 2 au sein de l'équipe ARNA de l'unité INSERM U1212 de l'Université de Bordeaux. En conclusion, nous discuterons des difficultés de la méthode SELEX, des améliorations de la technologie des aptamères et des perspectives d'avenir dans le domaine pharmaceutique.

MARQUEURS DU MELANOME & APTAMERES

PARTIE I – Le mélanome métastatique

1) Physiologie de la peau

La peau est le plus grand organe du corps humain. Son principal rôle est de constituer une barrière physique entre l'environnement extérieur et l'intérieur de l'organisme. Il est le premier organe affecté par les agressions extérieures : radiations, toxines, agents irritants, allergène (8). La peau exerce plusieurs fonctions essentielles pour la préservation de l'intégrité de l'organisme :

- Protection
- Thermorégulation
- Réponse immunitaire
- Limitation de la déshydratation par évaporation transépidermale de l'eau de l'organisme
- Sécrétion par la transpiration
- Sensation

La peau est composée de trois couches (de la plus superficielle à la plus profonde) : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (9). L'épiderme est la couche la plus affectée par les stimuli externes et la plus active, grâce à la couche basale, nommée « stratum basale », qui est en continuel renouvellement cellulaire (9). C'est un épithélium stratifié composé de différentes cellules, dont la localisation dans le tissu est dépendante du rôle du type cellulaire (Figure 1). On y trouve des kératinocytes conférant à la peau ses propriétés d'imperméabilité, des mélanocytes qui protègent des radiations UV ainsi que des cellules de Langerhans impliquées dans la défense immunitaire.

En réponse aux agressions extérieures, d'autres cellules de l'organisme peuvent migrer jusqu'à l'épiderme : des lymphocytes du système immunitaires, des macrophages du derme, des neutrophiles et des éosinophiles (8).

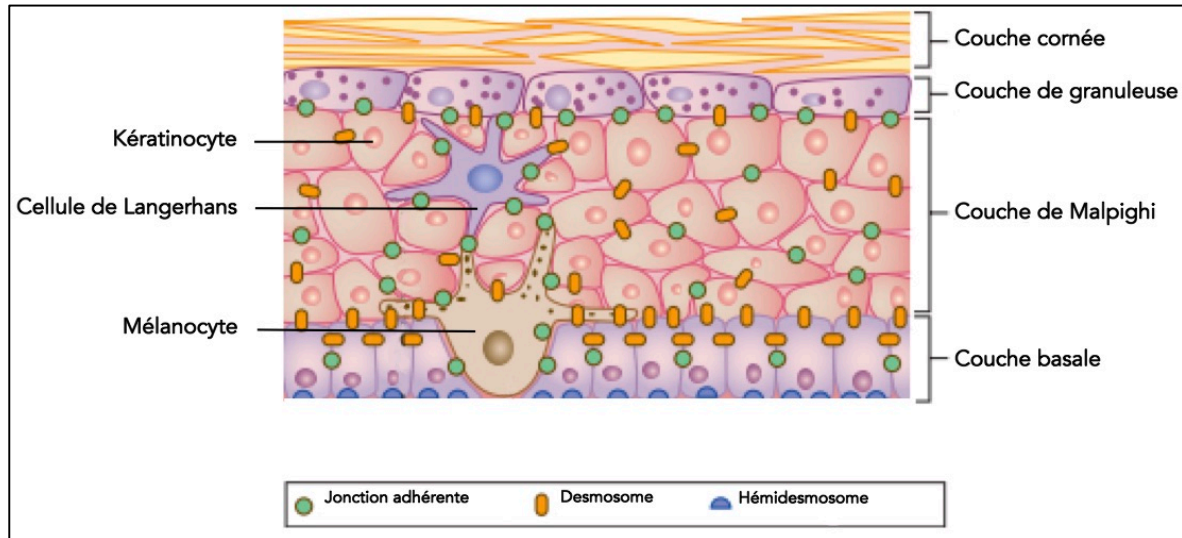


Figure 1 - Représentation de la structure de l'épiderme.

Les quatre différentes couches constituant l'épiderme sont la couche cornée, la couche granuleuse, la couche de Malpighi et la couche basale. La couche de Malpighi est constituée de kératinocytes liés entre eux par des jonctions adhérentes et des desmosomes. Les cellules de Langerhans se trouvent dans cette même couche tandis que les mélanocytes sont ancrés à la jonction entre couche de Malpighi et couche basale. Cette dernière couche est ancrée au derme sous-jacent à l'aide d'hémidesmosomes.

2) Physiopathologie du mélanome

Le mélanome est un cancer consécutif à une prolifération incontrôlée de cellules : les mélanocytes (10). Ils sont présents à une densité de 1500 mélanocytes par millimètre carré de peau (8). Les mélanocytes possèdent des organites intracellulaires appelés mélanosomes dans lesquels est synthétisé un pigment : la mélanine (8). Celle-ci est transférée aux kératinocytes, permettant la pigmentation de la peau. La mélanine protège la peau des radiations du soleil en absorbant une grande partie de la lumière, du spectre UV au spectre visible. Cette protection limite la dégradation de la vitamine B9 (acide folique), indispensable à la synthèse de l'ADN et de l'ARN, par les UV-A émis par le soleil (11). Les mélanocytes sont généralement retrouvés comme cellules individuelles au sein de l'épiderme, mais peuvent proliférer localement de manière bénigne, conduisant à la formation d'un nævus (10), communément appelé « grain de beauté ».

La prolifération incontrôlée de mélanocytes menant à la formation de la tumeur primaire a deux origines possibles :

- Un mélanocyte individuel, sans signes précurseurs, qui après prolifération, formera un nævus.
- Un nævus préexistant.

Les cellules tumorales vont proliférer jusqu'à s'infiltrer dans le derme. Elles vont alors interagir avec les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques, et vont quitter la tumeur primaire pour se disséminer dans le reste de l'organisme et former des tumeurs secondaires. Il s'agit de la dernière évolution possible du mélanome : le mélanome métastatique (10).

Le mélanome possède une forte charge mutationnelle. Les mutations les plus fréquentes concernent les gènes codant les protéines impliquées dans des voies de signalisation comme MAPK (mitogen-activated protein kinase) ou PI3K (phosphoinositol-3-kinase), qui contrôlent des mécanismes cellulaires comme la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Figure 2). Parmi ces gènes, le plus important est celui codant pour la BRAF Ser/Thr Kinase qui régule la voie de signalisation MAPK. La mutation V600E dans la protéine BRAF est la plus fréquemment retrouvée dans les cas de mélanome cutané associé à une surexposition solaire (12). Cette mutation entraîne une augmentation de l'activité de la protéine BRAF et conduit à une dérégulation de la voie de signalisation MAPK.

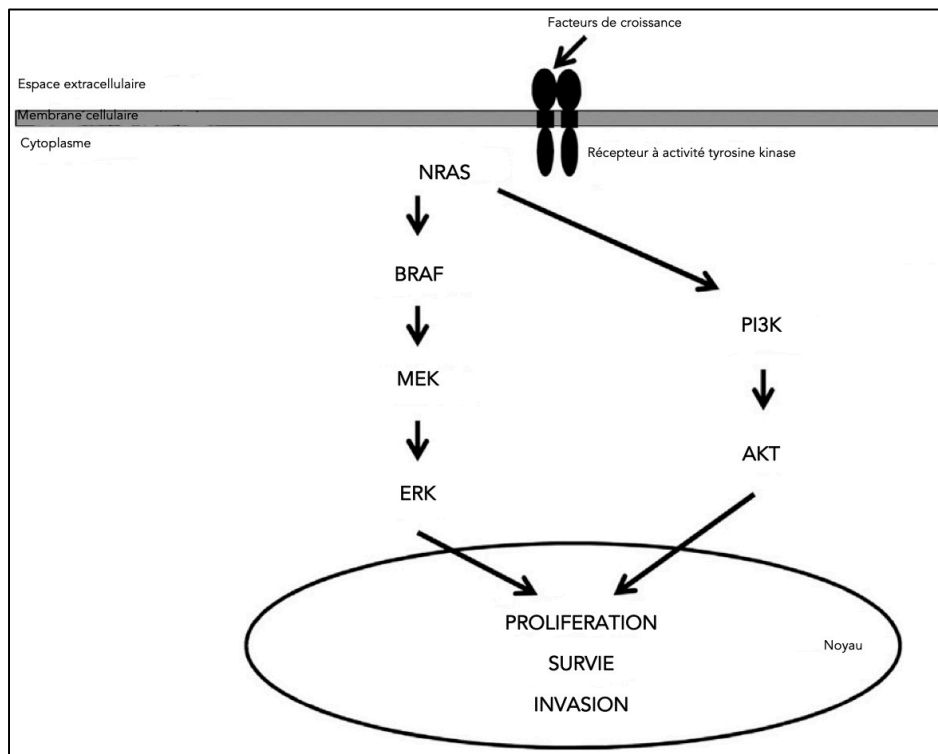


Figure 2 - Schéma simplifié des voies de signalisation des MAPK et PI3K.

Les facteurs de croissance activent les RTK en se fixant à leur domaine extracellulaire. La protéine NRAS (Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog) est stimulée et active les voies de signalisation intracellulaire MAPK et PI3K. En se liant à la protéine BRAF (B-Raf Sérine/Thréonine kinase), elle induit la cascade de phosphorylation des MAPK qui active MEK (ou MAP2K pour Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase) puis ERK (Extracellular signal-regulated kinase). NRAS active également la voie PI3K qui va recruter la protéine AKT (ou Protéine Kinase B). Les protéines ERK et AKT peuvent être transloquées dans le noyau et activer des facteurs de transcription inducteur de signaux de prolifération, de survie et d'invasion cellulaire.

3) Facteurs de risque

La prolifération incontrôlée des mélanocytes est induite par une interaction de facteurs de risque extrinsèque et intrinsèque (13).

Le principal facteur de risque extrinsèque est l'exposition aux rayons UV. Ces derniers sont d'origine naturelle (émis par le soleil) ou d'origine artificielle (émis par les lampes UV) (14). Une exposition intermittente aux UV augmente le risque de survenue de brûlure de la peau, ou « coup de soleil » (15). La période de survenue de la brûlure n'a pas d'impact sur la survenue d'un mélanome (16). Cependant, le nombre de brûlures subies par un individu semble accroître ce risque (12,16).

Les facteurs intrinsèques sont :

- le nombre de nævi qui est déterminant pour la survenue d'un mélanome superficiel extensif, qui est la forme la plus fréquente de mélanome (17).
- les antécédents familiaux qui peuvent augmenter le risque de survenue de mélanome, si celui-ci est associé à une exposition importante aux rayons UV (18).
- la susceptibilité génétique liée à la couleur de peau qui est déterminée par des gènes, notamment le gène codant pour le récepteur MC1R de l'hormone de stimulation des mélanocytes (19). Les mélanocytes des individus des populations non-blanches synthétisent en plus grand nombre des mélanosomes de volume important, par rapport aux individus des populations blanches, permettant une meilleure protection à l'exposition solaire et donc une incidence plus faible chez ces populations (19,20).

4) Épidémiologie du mélanome

Le mélanome représente 4% des cas de cancers de la peau en France (les 96% restant sont des carcinomes), mais est responsable de 80% des décès par cancer de la peau (12). Alors que les incidences de la majorité des cancers tendent à diminuer depuis le début du XXIème siècle (13), l'incidence du mélanome est en forte augmentation depuis les années 80 (21). Ainsi, en France, l'incidence standardisée sur la population mondiale (TSM) du mélanome a augmenté sur la période de 2005 à 2012, et le taux de mortalité est stable depuis 1980 (Figure 3).

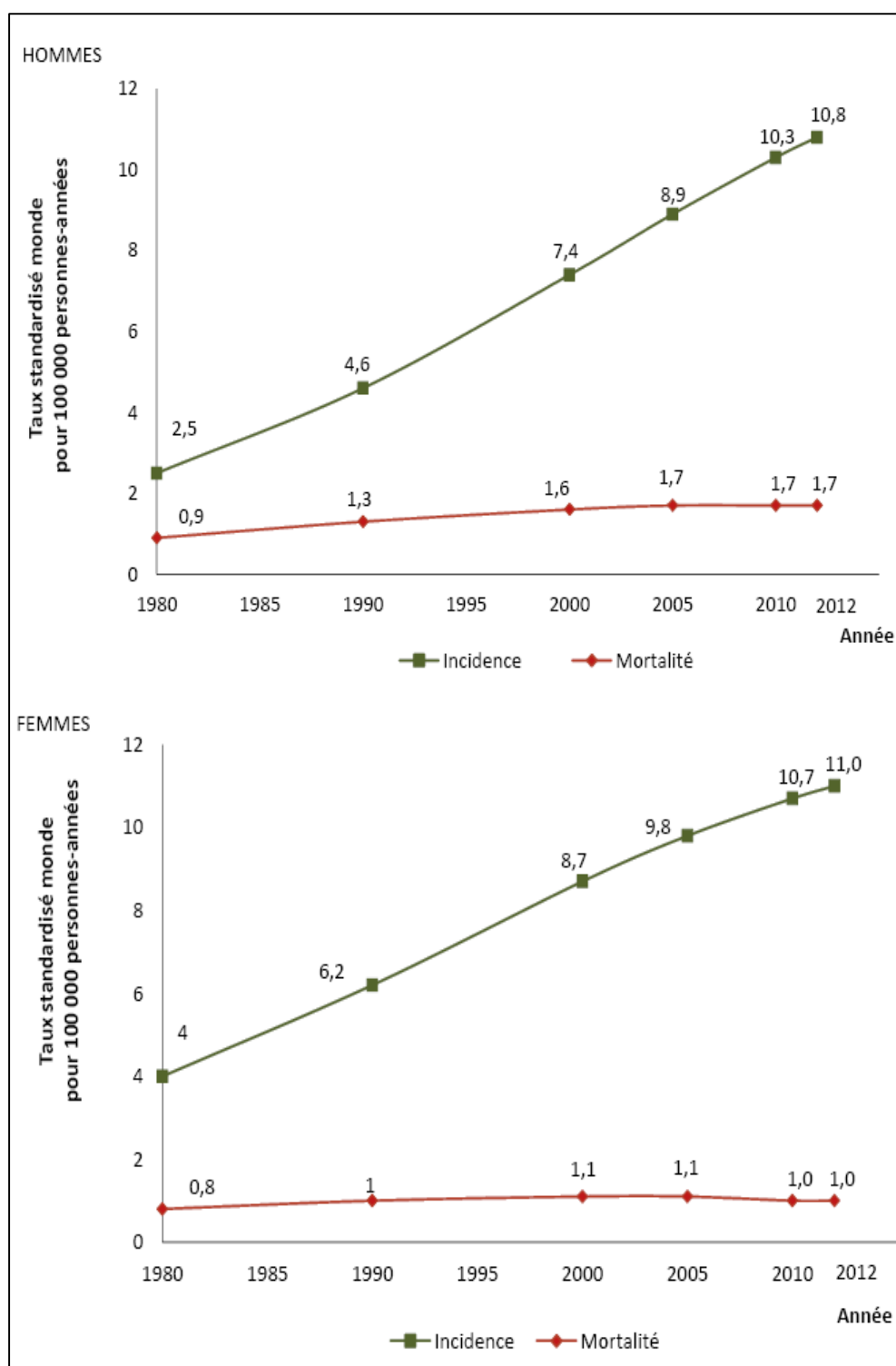


Figure 3 - Évolution de l'incidence et du taux de mortalité du mélanome cutané de 1980 à 2012 (InCA).

Le taux d'incidence a augmenté en moyenne de 2,9% par an chez l'homme et de 1,7% par an chez la femme, atteignant respectivement 10,8 et 11,0 nouveaux cas pour 100 000 personnes-années (PA). Le taux de mortalité est stable depuis 1980, avec en 2012 un taux plus élevé chez l'homme (1,7 décès pour 100 000 PA) que chez la femme (1,0).

D'après les données des années 2000, l'incidence et le taux de mortalité augmentent avec l'âge. L'incidence chez la femme est supérieure à celle chez l'homme jusqu'à 65 ans, mais le taux de mortalité est supérieur chez l'homme quel que soit l'âge (22). En 2012, l'âge médian au diagnostic est de 64 ans chez l'homme et de 61 ans chez la femme. Le taux de survie nette du mélanome à 5 ans (standardisée sur l'âge) est de 92% pour les cas diagnostiqués entre 2005 à 2010. Il diminue chez les patients de plus de 75 ans (21). Trois facteurs peuvent expliquer les différences de taux entre les hommes et les femmes :

- L'épaisseur de la peau, plus élevée chez les hommes, rend plus difficile l'observation d'une lésion par le patient lui-même (22).
- La localisation des lésions sur des zones difficiles d'accès chez l'homme comme le cou ou le dos, contrairement aux extrémités chez la femme (23).
- Le manque d'observation de leur peau par les hommes, permettant un dépistage précoce, et l'utilisation moins fréquente de protection par rapport aux femmes (24)

Concernant la population mondiale, l'incidence moyenne est de 3,0 nouveaux cas pour 100 000 personnes-années (PA) avec des différences importantes selon les zones géographiques (21) : de 0,2 en Asie du Sud à 30,5 en Australie pour 100 000 PA pour les femmes, et de 0,3 en Asie du Sud à 40,3 en Australie pour 100 000 PA pour les hommes. Le taux de mortalité est de 0,7 décès pour 100 000 PA (0,9 pour les hommes et 0,6 pour les femmes).

L'augmentation de l'incidence et le taux de mortalité par cancer de la peau font du mélanome cutané un problème socio-économique majeur, et un principal enjeu de la recherche contre le cancer (13).

5) Du mélanome au mélanome métastatique

La capacité des cellules tumorales à former rapidement des métastases à partir de la tumeur primaire est une des raisons de la mortalité associée au mélanome (10). Les cellules tumorales des cancers métastatiques peuvent adopter un phénotype invasif. Le mélanome est caractérisé par la modification des interactions de la cellule avec la matrice extracellulaire (MEC), entraînant une rupture de l'organisation cellulaire du tissu et contribuant au caractère invasif et migratoire de la métastase. Cette capacité migratoire est intrinsèque aux mélanocytes. En effet, lors de la formation embryonnaire, les mélanoblastes, précurseurs des mélanocytes, possèdent déjà la capacité de migrer du tube neural pour coloniser l'épiderme (11). Les métastases du mélanome vont se former de préférence dans les poumons, le cerveau, le foie et la peau (25). Les gènes impliqués dans ce processus peuvent être surexprimés dès la formation de la tumeur primaire (25).

La croissance de la tumeur primaire jusqu'au tissu de soutien contenant les vaisseaux sanguins et lymphatique va induire la formation de micro-métastases. Elles vont pouvoir rester dormantes ou proliférer pour devenir des métastases (26). Dans tous les types de cancers, les cellules tumorales vont passer par différentes étapes afin d'être disséminées dans l'organisme et former des métastases dans d'autres tissus (Figure 4) (26) :

- Une protection composée de plaquettes est formée autour des cellules tumorales, fragiles en dehors du microenvironnement tumoral, leurs permettant d'échapper au système immunitaire.
- Elles sont ensuite transportées dans le système circulatoire ou le système lymphatique.
- Le ralentissement du flux sanguin à l'entrée d'un organe permet la formation de micro-métastase par agrégation des cellules tumorales.
- Les micro-métastases formées adhèrent aux cellules endothéliales ou à la membrane basale sous-jacente. S'il n'y a pas adhérence, alors les cellules entrent en apoptose conduisant à la mort cellulaire des cellules tumorales.
- Les cellules vont par la suite sortir du vaisseau à travers la barrière endothéliale et s'infiltrer dans le tissu cible.
- La cellule va devoir ensuite s'adapter au nouveau microenvironnement : c'est l'étape d'ancrage. La cellule tumorale va utiliser les facteurs de croissance synthétisés par l'environnement, et éviter les cytokines inhibitrices de la croissance cellulaire.
- L'angiogenèse est indispensable à la survie de la cellule, qui va pouvoir proliférer et ainsi former une métastase.

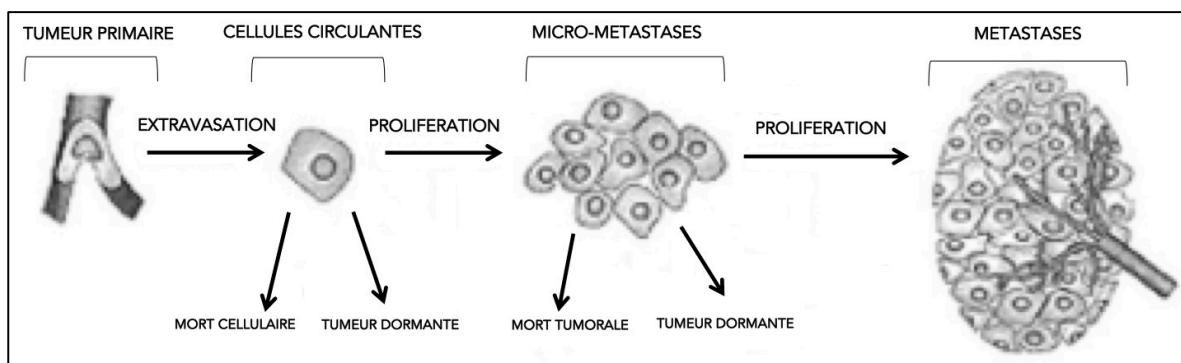


Figure 4 - Schéma des étapes de formation des métastases.

A partir de la tumeur primitive, les cellules tumorales vont rejoindre la circulation sanguine ou lymphatique. Elles vont alors soit entrer en apoptose (mort cellulaire) soit devenir des cellules dormantes. Ces dernières vont continuer à proliférer pour former une micro-métastase. Celle-ci peut alors infiltrer un organe, et former une métastase après prolifération.

6) Diagnostic du mélanome métastatique

Le mélanome est le plus agressif et le plus mortel des cancers de la peau (27). Le pronostique dépend du degré d'invasion de la tumeur primaire (13) : plus le diagnostic est précoce, moins le risque de mortalité est élevé. D'une manière générale, le diagnostic clinique par des méthodes histopathologiques est suffisant pour diagnostiquer la plupart des mélanomes (27). La principale technique utilisée est la dermoscopie (28). Il s'agit d'une technique non-invasive d'observation des structures pigmentées présentes dans l'épiderme, de la surface de l'épiderme jusqu'à la jonction dermo-épidermale (Figure 5). C'est la technique la plus sûre pour le diagnostic d'un mélanome par un expert dermatologue formé à la technique (29), en comparaison à l'examen clinique à l'œil nu.

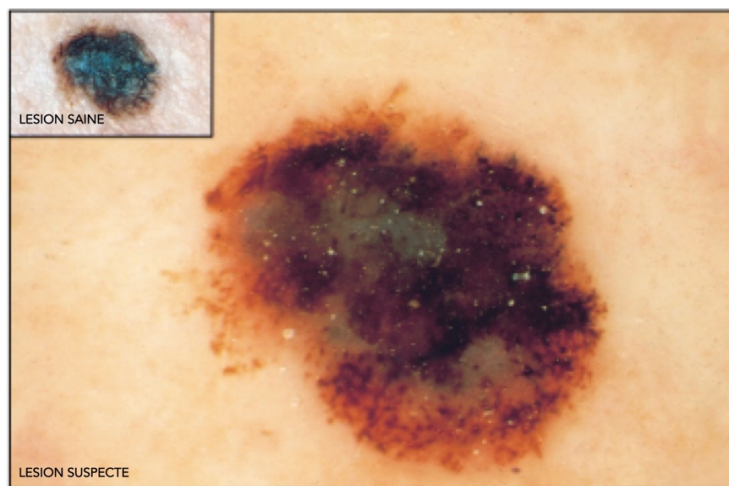


Figure 5 - Photographies de lésions cutanées

Dans le petit cadre, on observe une lésion cutanée saine dont la forme est définie et la pigmentation homogène. Dans le grand cadre, on observe une lésion suspecte dont les contours ne sont pas délimités, avec une pigmentation hétérogène présentant des zones décolorées.

La dermoscopie pouvant être insuffisante pour l'observation de certains types de nævi difficile à atteindre, l'exérèse chirurgicale, ou biopsie, de la lésion suspecte peut être effectuée. Des tests immuno-histochimiques (27) permettent d'évaluer de nombreux critères histologiques : le niveau d'invasion de la tumeur (niveau de Clark), son épaisseur (indice de Breslow), la présence d'ulcération et l'index mitotique (12).

Un diagnostic moléculaire ciblant des marqueurs tumoraux est effectué dans les cancers métastatiques : il permet l'adaptation de la chimiothérapie aux mutations présentes, et est essentiel à l'efficacité du traitement et à la survie du patient (30).

7) Thérapies actuelles du mélanome métastatique

En France, les traitements du mélanome métastatique doivent être adaptés à chaque patient, au cours de réunion interdisciplinaire (31).

Le traitement en première intention du mélanome métastatique est l'exérèse chirurgicale totale de la tumeur primaire et des métastases peu nombreuses et peu étendues, accessibles facilement telle que les métastases cutanées (30). La radiothérapie peut être préconisée lorsque la taille de la tumeur ou des métastases est trop importante, ou que les métastases sont nombreuses, et/ou localisées au niveau des os ou du cerveau (30).

Le mélanome métastatique de stade III, dont les métastases sont inopérables par chirurgie, et de stade IV sont traités par voie systémique (12). Les deux objectifs de ces traitements sont d'augmenter la survie du patient et de réduire la taille des tumeurs ou des métastases (30). Jusqu'à la fin des années 2000, le traitement de choix a été la chimiothérapie avec la dacarbazine, un agent alkylant (12). Le faible taux de réponse au traitement (10 à 15%) et la courte survie médiane des patients (8 mois) traité par dacarbazine ont conduit à la recherche d'alternatives thérapeutiques plus efficace et provoquant moins d'effets indésirables (32). On distingue deux axes d'alternatives : l'immunothérapie et les thérapies ciblées (12).

L'immunothérapie dans le domaine de la cancérologie s'est développée à partir de la découverte d'une inhibition de la réponse anti-tumorale du système immunitaire par la tumeur, comportant des points de contrôle immunologique. Ceci a permis de développer des anticorps antagonistes, les inhibiteurs de check-point immunologique (ICP), qui vont supprimer l'inhibition des lymphocytes T par la tumeur, et ainsi stimuler la réponse anti-tumorale (12). Le premier anticorps monoclonal de la classe des ICP développé est l'ipilimumab. En bloquant le récepteur CTL-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) des lymphocytes T, l'activité anti-tumorale de ces dernier est augmentée (32). D'autres anticorps monoclonaux ICP ont été développés, comme le nivolumab et le pembrolizumab. Ces deux anticorps se fixent au récepteur PD-1 (Programmed cell death 1) présent à la surface des lymphocytes T et empêchent l'induction de l'apoptose de ces lymphocytes.

Pour augmenter la réponse thérapeutique et diminuer la survenue d'effets indésirables, des thérapies ciblant les différentes mutations génétiques impliquées dans le mélanome ont été développées. Le vemurafenib est le premier inhibiteur sélectif de la mutation BRAF V600E (la plus fréquente dans les mélanomes) commercialisé en France (12). L'inhibition de la kinase BRAF réduit la prolifération tumorale (32). Cette thérapie ciblée a permis d'augmenter le taux de survie des patients à six mois, et de réduire le taux de mortalité, en comparaison à la

chimiothérapie par dacarbazine. Cependant, le mélanome peut développer une résistance aux inhibiteurs de BRAF, constituant un échappement thérapeutique (32).

Afin d'éviter les échappements thérapeutiques et de réduire le risque de survenue d'effets indésirables des différentes molécules, des thérapies adjuvantes sont également indiquées dans le traitement des cancers en général. Ces molécules vont cibler différents constituants cellulaires impliqués dans la formation et la migration des métastases, comme le bevacizumab (Avastin®), un anticorps monoclonal anti-VEGF, inhibiteur de l'angiogenèse tumorale (33).

Dans le cadre du mélanome, l'efficacité des thérapies standards est limitée par la survenue des effets indésirables et par l'apparition de mécanismes de résistance à la chimiothérapie (34). La recherche et l'intégration de nouveaux marqueurs tumoraux moléculaires du mélanome sont essentielles pour le développement d'outils thérapeutiques et diagnostiques.

PARTIE II : Marqueurs tumoraux d'intérêt : les récepteurs DDR

1) Marqueur tumoral : définitions et intérêts

Les marqueurs tumoraux sont des biomarqueurs retrouvés dans les pathologies cancéreuses. Leur étude joue un rôle important dans la découverte de nouvelles thérapies (3). Le terme marqueur tumoral désigne les substances, généralement des protéines, exprimées directement par les cellules tumorales ou par les cellules de l'organisme en réponse à un phénomène tumoral (35). Ces marqueurs peuvent être spécifiques d'un type particulier de cancer ou leur surexpression peut être associée au développement de plusieurs types de cancer. Il existe deux types de marqueurs tumoraux (36) : des marqueurs tissulaires et des marqueurs sériques. Une des stratégies pour le développement de thérapies est d'étudier les marqueurs tumoraux, notamment grâce à des techniques d'études génomiques, protéomiques et de métabolomiques qui permettent de comprendre les mécanismes intracellulaires conduisant aux phénomènes cancéreux (37).

Dans le cadre du mélanome métastatique, notre intérêt va se porter sur des marqueurs tumoraux tissulaires impliqués dans la formation et la dissémination des métastases : les récepteurs DDR (« Discoidine Domain Receptor »). Il s'agit de récepteurs appartenant à la famille des récepteurs à activité tyrosine-kinase (RTK), exprimés à la surface d'un grand nombre de cellules dont les mélanocytes.

2) Les récepteurs à activité tyrosine kinase

Les RTK sont impliqués dans des phénomènes cellulaires physiologique et physiopathologique indispensables : croissance et différenciation cellulaire, métabolisme intracellulaire, mobilité (38). Ils sont composés de deux domaines (Figure 6):

- Un domaine extracellulaire en N-terminal, permettant la liaison de ligands d'origine extracellulaire,
- Un domaine intracellulaire en C-terminal, composé d'un domaine juxtamembranaire lié à un domaine tyrosine kinase responsable de la transduction du signal intracellulaire.

Les deux domaines sont liés entre eux par un domaine transmembranaire prenant la forme d'une hélice alpha, ancrée dans la membrane cellulaire. Les RTK sont ainsi classés par rapport à la nature de leur domaine extracellulaire. La liaison d'un ligand entraîne la phosphorylation du domaine intracellulaire, induisant un signal intracellulaire.

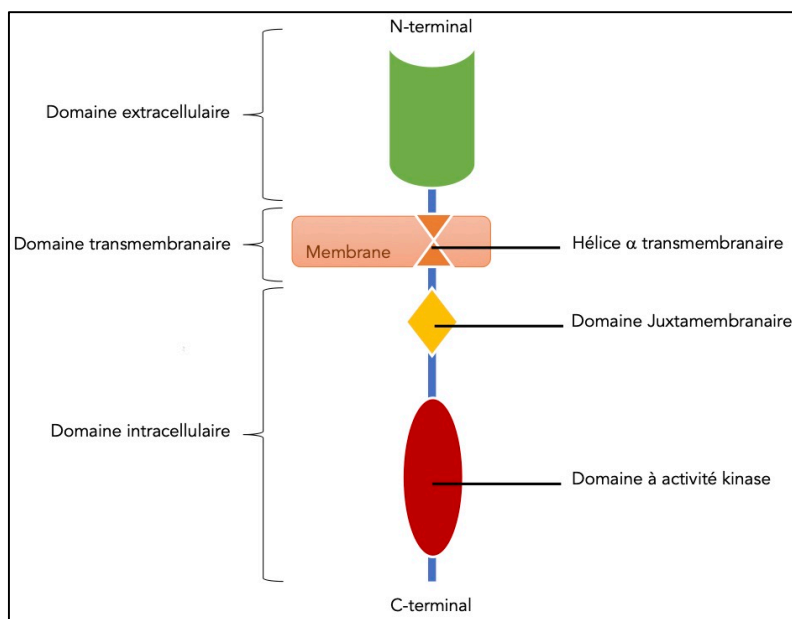


Figure 6 - Représentation schématique des différents domaines d'un RTK

Les RTK sont composés d'un domaine extracellulaire en N-terminal qui permet la fixation d'un ligand ; d'une hélice alpha transmembranaire permettant la stabilité du récepteur à la surface de la cellule ; d'un domaine intracellulaire en C-terminal composé d'un domaine à activité kinase. La phosphorylation du domaine tyrosine kinase permet l'activation du récepteur et la transduction d'un signal initiateur d'une cascade de signalisation intracellulaire.

3) Les récepteurs DDR

Parmi les familles de RTK, le groupe des Discoidin Domain Receptor (DDR) présente un intérêt particulier dans la recherche sur le mélanome cutané. Ces récepteurs ont été découverts dans les années 1990 (39). On distingue deux principaux types de récepteurs, DDR1 et DDR2. Ces récepteurs ont une structure intracellulaire commune à tous les RTK, mais présentent deux domaines extracellulaires ; un domaine discoïdine (DS) et un domaine discoidin-like (DS-like) (Figure 7). Ces domaines permettent de se lier aux fibres de collagène présent dans la matrice extracellulaire (MEC) (40). Alors qu'il n'en existe pas pour DDR2, DDR1 présentent cinq isoformes : DDR1a, b, c, d, et e. Seules les isoformes a, b et c possèdent un domaine kinase actif (41).

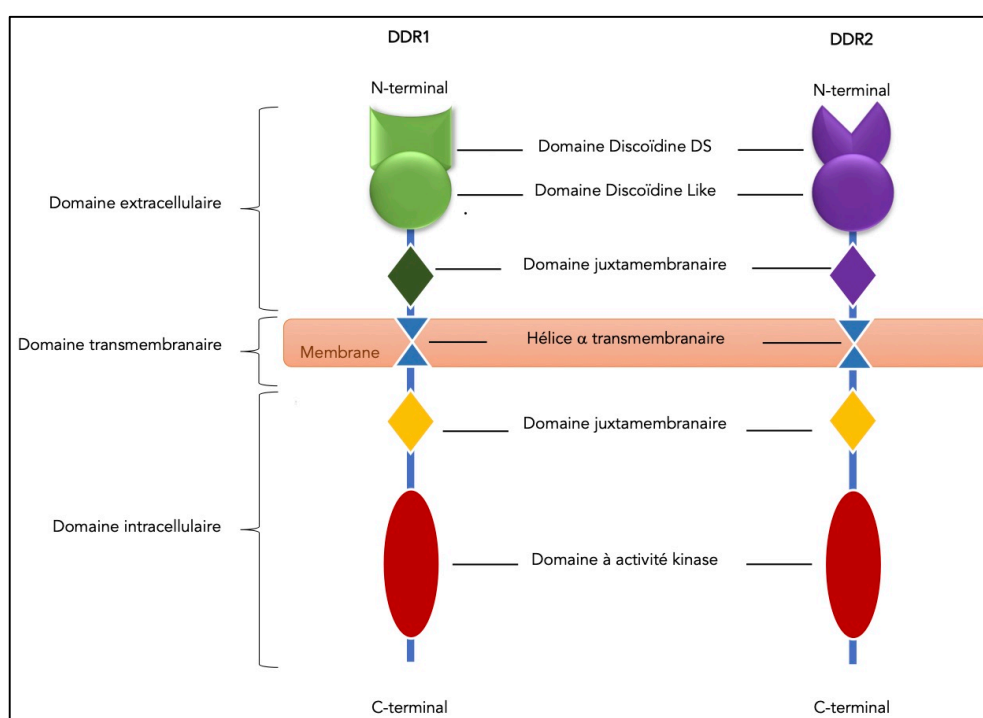


Figure 7 - Représentation schématique de DDR1 et DDR2

Les récepteurs DDR sont des RTK dont les domaines extracellulaires sont composés de deux domaines : un domaine discoidine et un domaine discoidin-like. Ces domaines permettent la fixation aux fibres de collagènes sous forme native de triple hélice, présentes dans la MEC.

Grâce à leur domaine DS et DS-like extracellulaire, ils se lient aux fibres de collagènes dans leur conformation active de triple hélice (42). Le collagène est le composant le plus abondant de la matrice extracellulaire (43). Son rôle principal est le maintien structural des différents tissus du corps humain. Il possède également des rôles dans les processus cellulaires comme l'adhésion, la migration, les interactions intercellulaires, mais également dans la croissance et la différenciation cellulaire (44). Chez les vertébrés, il existe au moins 27 types de fibres de

collagènes. La localisation de chaque type de fibre dans l'organisme est dépendante du tissu. Ainsi, certaines fibres sont retrouvées dans un tissu particulier, comme le type XVII, présent exclusivement dans les hémidesmosomes cutanés, jonctions entre une cellule de la peau et la matrice extracellulaire (43). Les différentes fonctions du collagène peuvent être utilisées par les cellules tumorales pour permettre l'invasion tumorale et les phénomènes cellulaires associés (45).

Les deux types de récepteurs DDR sont activés par les fibres de collagènes de type I, II, III et V sous leur forme active de triple hélice. DDR1 est également activé par liaison au type IV, retrouvé dans la membrane basale de l'épiderme (46), tandis que DDR2 est activé par liaison au type X, présent dans la matrice extracellulaire uniquement dans un contexte pathologique d'hypertrophie (47).

Les deux protéines DDR1 et DDR2 partagent un pourcentage d'identité de séquences d'environ 53% (Figure 8) (48). Les principaux domaines extracellulaires ont un pourcentage d'identité de 59% pour le domaine DS et de 51% pour le domaine DS-like (49). Par ailleurs, DDR1 et DDR2 présentent une structure semblable pour le site de fixation au collagène (Figure 9).

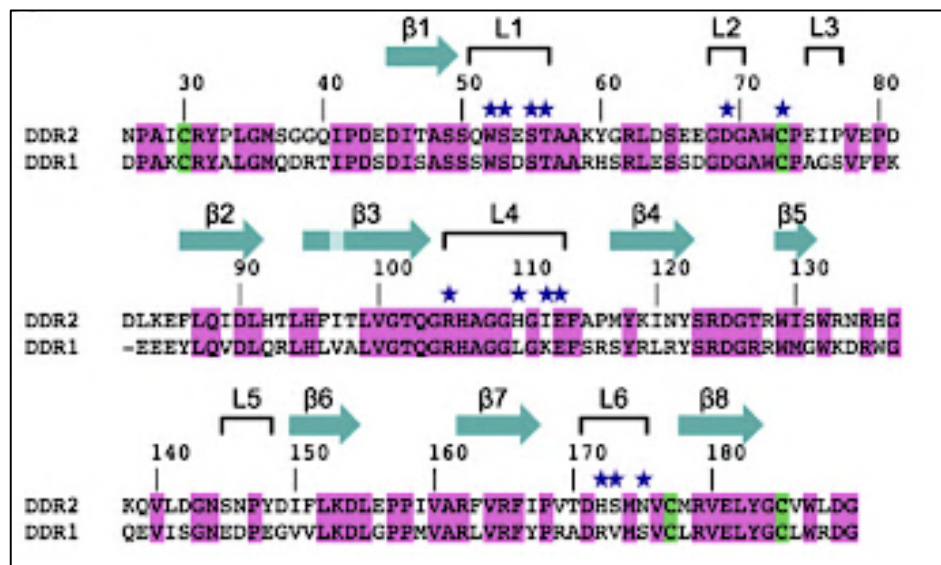


Figure 8 – Alignement des séquences des domaines DS de DDR1 et DDR2

La numération de séquences et les structures secondaires sont indiquées au-dessus des séquences. Les acides aminés communs aux deux protéines sont surlignés en magenta et les cystéines en vert.

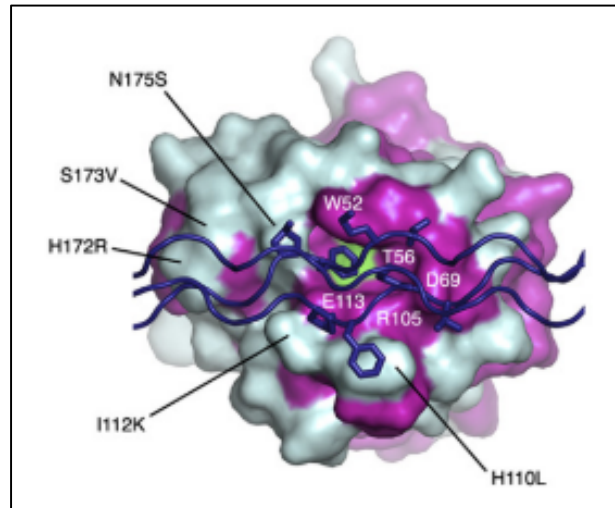


Figure 9 – Représentation du site de fixation du collagène dans le domaine DS de DDR2

Les acides aminés communs entre DDR1 et DDR2 sont représentés en magenta et en vert. Le collagène est représenté en violet sous format « sticks » permettant d'observer l'interaction du motif GVMGFO du collagène avec le site de fixation de DDR.

Activation des récepteurs DDR

De manière générale, les RTK sont présents à l'état de monomère à la surface de la cellule, et sont activés par dimérisation après fixation d'un ligand. Contrairement aux autres RTK, un DDR est présent à l'état basal sous forme de dimère à la surface de la cellule, avant même la liaison avec une fibre de collagène (50). D'après l'étude de Mihai *et al.* (2009), le récepteur serait par la suite internalisé pour permettre son activation, puis recyclé à la surface de la membrane, sans pour autant que l'on connaisse les mécanismes exacts de cette endocytose (41). Comme tous les récepteurs de la famille des RTK, les DDR sont activés par autophosphorylation. Les mécanismes d'autophosphorylation ne sont pas entièrement décrits, mais des études biochimiques ont pu déterminer l'implication du domaine à activité tyrosine kinase et l'importance du domaine transmembranaire des DDR (49) dans le mécanisme d'activation.

L'équipe de Carafoli a émis une hypothèse concernant le mécanisme d'activation d'un DDR. En absence de collagène, le récepteur est inactif, à l'état de dimère, grâce à une autoinhibition exercée par le domaine transmembranaire. Après contact avec une fibre de collagène, le DDR dimérisé est activé, avec un contact entre les deux domaines extracellulaires discoidines ; le domaine tyrosine kinase intracellulaire est autophosphorylé. Les DS activés d'un DDR peuvent former des contacts avec les DS activés d'un autre DDR, formant un ensemble de DDR activés par une même fibre de collagène.

Voies de signalisation impliquées par l'activation des DDR

Une fois activé, et selon leur localisation sur la surface de la cellule, les DDR vont activer des voies de signalisation intracellulaire. Ces voies conduisent à l'expression de protéines impliquées dans des mécanismes cellulaires. L'activation de ces voies a été illustrée par l'équipe de R.R. Valiathan (Figure 10), bien qu'elles ne soient pas toutes élucidées jusqu'à présent. Ainsi, les récepteurs DDR1 vont activer les voies de signalisation impliquées dans les phénomènes d'invasion cellulaire comme celles responsables de mécanismes de défense anti-apoptotique. Cette activation nécessite parfois un couplage à différentes protéines transmembranaires comme les intégrines. Ainsi, un récepteur DDR1 couplé à une E-cadhérine active la voie Par3/Par6 permettant l'adhésion entre cellules (51). Ce complexe régulerait l'implication de DDR1 dans la dissémination et la migration cellulaire. Concernant DDR2, des études ont pu montrer son rôle dans la surexpression des métalloprotéases matricielles (MMP) de la MEC, notamment MMP2 et MMP9, impliquées dans l'invasion et la migration des cellules tumorales du mélanome (52).

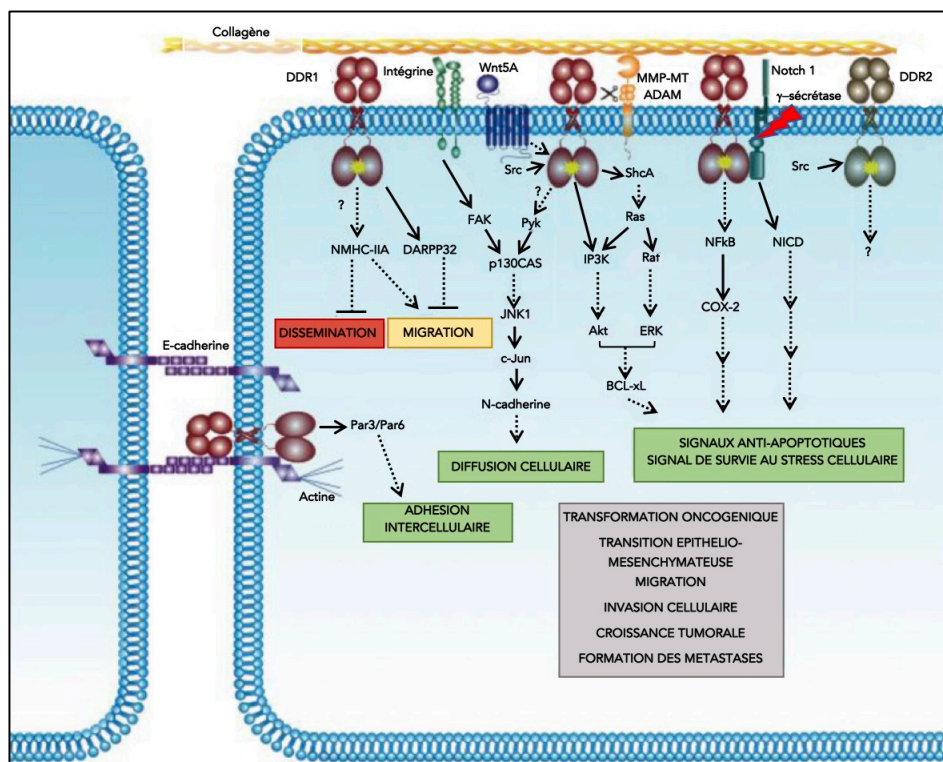


Figure 10 - Cascade de signalisation intracellulaire activée par les DDR décrite par Valiathan et al.

Sur cette figure : les lignes pleines représentent une action directe; les lignes en pointillées représentent une action indirecte ou nécessitant plusieurs étapes intermédiaires; les points d'interrogation marquent les mécanismes non-élucidés; les flèches dirigées vers les récepteurs indiquent les voies de signalisation les activant ; les flèches partant des récepteurs indiquent les voies de signalisations activées par les récepteurs. Les cadres verts indiquent les processus activés par les DDR. Le cadre rouge indique le processus inhibé par les DDR. Le cadre orange indique le processus activé ou inhibé par les DDR selon certaines conditions. Le cadre gris indique les processus associés à l'activité des DDR, mais dont les voies de signalisations ne sont pas élucidées.

Implication des DDR dans les phénomènes cellulaires.

L'invalidation génétique (« knock-out ») chez la souris a permis de démontrer les rôles majeurs des récepteurs DDR à l'échelle de différents organes dans un contexte physiologique (Tableau I) (41).

Tableau I - Fonctions de DDR1 et DDR2 chez la souris

Les conséquences de l'invalidation génétique de DDR1 et DDR2 sont listées, selon le système ou l'organe observé. L'absence de ces récepteurs induit des changements structuraux des tissus et des changements dans le comportement de certaines cellules telles que les fibroblastes et les macrophages. « NR » signifie « Non reporté ».

Knock out de :	DDR1	DDR2
Peau	NR	Réduction de la prolifération et l'invasion des fibroblastes, induisant une réduction de l'activité de cicatrisation.
Système squelettique	Réduction de la taille. Déméralisation des os.	Nanisme. Réduction de la taille des os.
Glande Mammaire	Défaut de croissance. Défaut de lactation.	NR
Rein	Épaississement de la membrane du glomérule. Réduction de l'adhésion de cellules à la MEC, et augmentation de leur prolifération.	NR
Système vasculaire	Réduction de l'adhésion et de la migration des cellules contractiles vasculaires vers le collagène de type I.	Pas d'effet sur l'adhésion, la migration ou la prolifération des cellules vasculaires.
Système immunitaire	Réduction de la réponse inflammatoire. Réduction du recrutement des macrophages.	Augmentation de l'inflammation et de la prolifération des macrophages et de cellules hépatiques dans les pathologies hépatiques chroniques
Oreille	Perte d'audition lié à des changements structuraux de l'oreille interne.	NR
Reproduction	Défaut d'implantation du blastocyste dans l'utérus.	NR

Implication des DDR dans les phénomènes tumoraux.

L'implication des récepteurs DDR dans l'invasion tumorale a été décrite dans de récentes études mettant en avant leur rôle dans le développement et la progression de différents cancers invasif (41). Les récepteurs DDR1 et DDR2 sont impliqués dans la surexpression de métalloprotéases matricielles (MMP) permettant la dégradation de la MEC (Figure 11) (52,53).

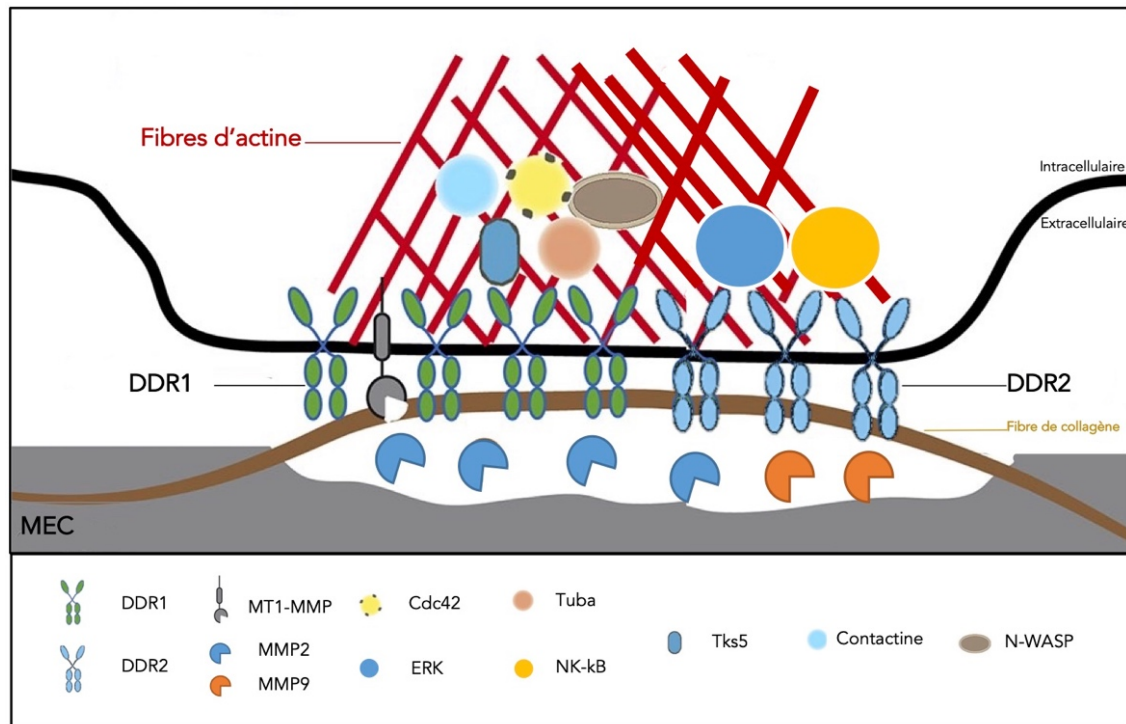


Figure 11 - Représentation schématique du recrutement des MMP par DDR1 et DDR2

Les DDR sont activés par leur fixation à une fibre de collagène. DDR1 active la protéine Cdc42 par le Tuba-GEF, et ainsi recruter des composants pour la formation de l'invadosome (N-WASP, Tks5, Contactine) qui va dégrader la MEC à l'aide de MMP2 et MT1-MMP. DDR2 active deux voies intracellulaire possible, ERK et NK-κB, qui vont induire la surexpression de MMP2 et MMP9.

Les MMP sont des protéines capables de dégrader le collagène, entraînant la dégradation et le remodelage de la MEC. Elles permettent à des structures comme les invadosomes de se déplacer et d'envahir son environnement par dégradation de la MEC. L'invadosome est un terme regroupant les podosomes, retrouvés dans les cellules normales, et les invadopodes retrouvés dans les cellules tumorales (54). Ce sont des structures cellulaires dynamiques, grâce aux fibres d'actine intracellulaire, permettant aux cellules de se déplacer par adhésion ou de permettre la transduction d'un signal. La présence des invadopodes est corrélée au caractère invasif des cellules tumorales. Selon le type cellulaire, cette structure est associée à des fonctions cellulaires comme l'angiogenèse. Les DDR sont retrouvées à la surface cellulaire des invadosomes, à des localisations différentes selon le type de cellules tumorales (Figure 12) (55).

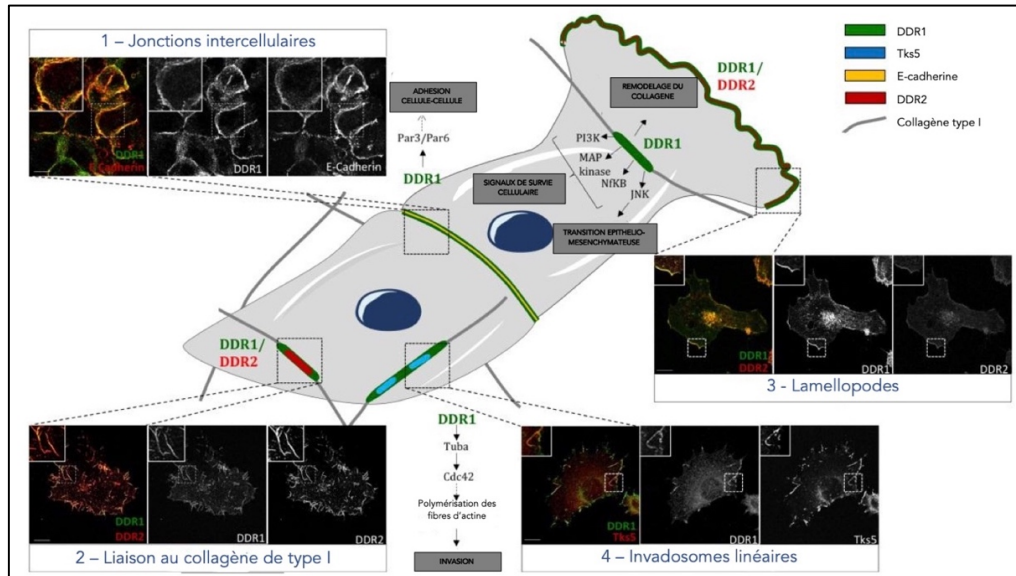


Figure 12 - Fonctions des DDR selon la localisation à la membrane cellulaire

Représentation schématique illustrant la localisation des DDR à la surface d'un invadosome et les fonctions associées. Les voies de signalisation associées sont également indiquées. 1) Dans les cellules de carcinome A431, DDR1 interagit avec la Cadherine-E pour préserver la jonction entre deux cellules de même nature. 2) Dans les cellules de mélanome A375, DDR1 et DDR2 sont colocalisés pour se fixer aux fibres de collagène I. 3) Dans les cellules de mélanome A375, DDR1 est colocalisé avec Tks5, biomarqueur des invadosomes. 4) Dans les cellules métastatiques de mélanome A375, DDR1 et DDR2 sont colocalisés dans les lamellopodes, sous-structures permettant le déplacement de la cellule.

Concernant le mélanome cutané, les multiples rôles des DDR ont été démontrés par l'étude des cellules tumorales de la lignée A375 du mélanome (55). Ils sont impliqués dans l'expression de différents gènes permettant la survie des cellules tumorales (Figure 13).

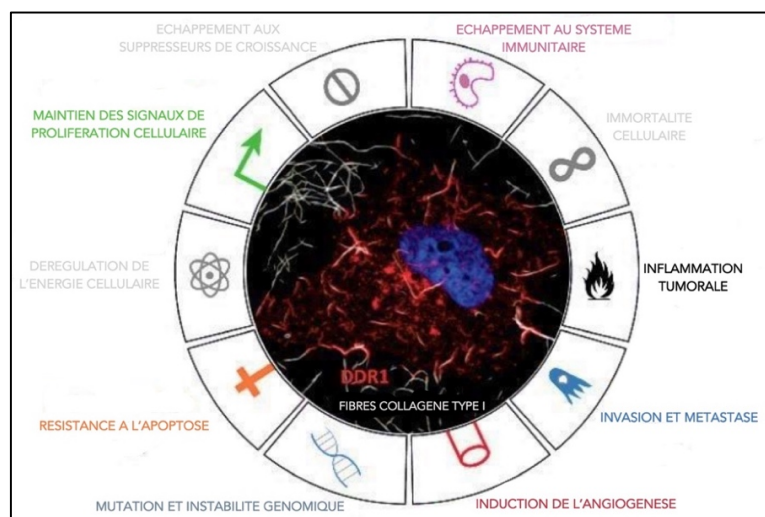


Figure 13 - Contribution des récepteurs DDR dans le cancer

Au centre, une représentation des cellules A375 en microscopie confocale : la cellule avec le noyau (en bleu) exprimant DDR1 (rouge) est colocalisé au niveau des fibres de collagène (gris clair). Autour de cette image, la liste énumère les phénomènes cancéreux dans lesquels DDR1 et DDR2 sont impliqués : résistance contre la réponse immunitaire anti-tumorale, inducteur de la réponse inflammatoire tumorale, activation de l'invasion et de la migration cellulaire, inducteur de l'angiogenèse, résistance à l'apoptose, maintien des signaux de prolifération cellulaire.

Potentielles cibles thérapeutiques.

Des molécules thérapeutiques ciblant des DDR ont déjà été commercialisées aux États-Unis (56,57) : il s'agit d'inhibiteurs comme le dasatinib, le nilotinib, l'imatinib et le ponatinib. Ces inhibiteurs se lient au domaine tyrosine kinase : ils sont alors en compétition avec l'ATP, empêchant sa fixation au domaine tyrosine kinase. Ainsi, le récepteur ne peut pas être activé par phosphorylation et les voies de signalisation intracellulaire décrites précédemment sont inhibées.

Cependant, la plupart des petites molécules inhibitrices développées sont également capables d'inhiber d'autres RTK, et un même inhibiteur peut se fixer à DDR1 et à DDR2, à cause de leur forte similarité structurale (58). Les études ont également montré que l'inhibition seule de DDR1 est insuffisante pour inhiber la croissance cellulaire de cellules tumorales : d'autres études sont nécessaires pour préciser le rôle des DDR dans le développement des cancers. Le développement de nouveaux agents inhibiteurs de DDR permettant un ciblage plus spécifique de ces récepteurs est nécessaire pour explorer le rôle de ces derniers dans les mécanismes physiopathologiques et pour le développement de thérapies.

4) Ciblage d'un marqueur tumoral par un biosenseur

Le ciblage moléculaire des marqueurs tumoraux constitue un intérêt majeur pour le diagnostic et le traitement des cancers. Il est fondé sur le principe de liaison à haute affinité d'un ligand pour une cible macromoléculaire spécifique. Le développement de biosenseurs comme ligand de marqueur biologique est la stratégie la plus prometteuse pour le développement d'outil de recherche, thérapeutiques et diagnostic (6).

Actuellement, trois catégories de biosenseurs possèdent les caractéristiques nécessaires pour le ciblage (59) : les anticorps, les aptamères et les peptides-aptamères. Ces catégories de senseurs ont leurs avantages et inconvénients, mais présentent tous la capacité de fixation affine et hautement spécifique à leur cible. Les anticorps sont les plus anciens à avoir été découverts, il y a environ 120 ans, et sont les mieux décrits. Ce sont des molécules de haut poids moléculaire largement utilisées dans le ciblage moléculaire (60). Les technologies de sélection des peptides et des aptamères ont été découvertes plus récemment, dans les années 1990 (61,62). Leur principe de fixation d'une cible est proche de celui des anticorps.

Dans l'objectif de développer un senseur des marqueurs tumoraux DDR, avec une application en thérapie et en diagnostic, nous allons nous intéresser à la technologie des aptamères en présentant leur nature et le processus de sélection permettant leur obtention.

PARTIE III : Propriétés et méthodes de sélection des aptamères

1) Définitions et mécanisme d'action

Les aptamères sont des oligonucléotides simple brin en chimie ADN ou ARN (63,64). Leur taille peut atteindre les 100 bases, et leurs poids moléculaire est en moyenne compris entre 8 et 15 kDa. Leur taille est intermédiaire entre les anticorps (environ 150 kDa) et les peptides (1 à 5 kDa). Ils sont également plus petits que le fragment variable des anticorps (65). Les acides nucléiques ADN et ARN sont composés d'un enchaînement de nucléotides formant un brin. Ces nucléotides sont constitués par trois éléments (Figure 14) :

- Une base azotée qui peut être :
 - Purique : adénine (A), guanine (G)
 - Pyrimidique : cytosine (C), thymine (T), uracile (U)
- Un ose : le ribose (ARN) ou le 2'-désoxyribose (ADN).
- Un groupement phosphate assurant un lien phosphodiester entre les oses.

Il existe deux différences majeures entre l'ADN et l'ARN :

- Concernant le sucre : on trouve un 2'-désoxyribose dans l'ADN et un ribose dans l'ARN.
- Concernant la base azotée : l'adénine, la guanine et la cytosine sont commune aux deux types d'acide nucléique. La thymine est spécifique de l'ADN tandis que l'uracile est spécifique de l'ARN : le groupement méthyle en C5 sur la thymine est absent dans l'uracile.

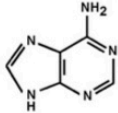
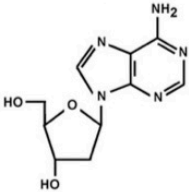
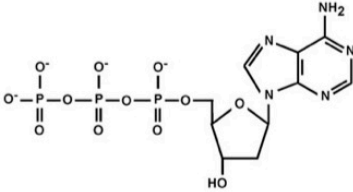
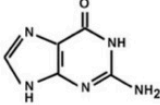
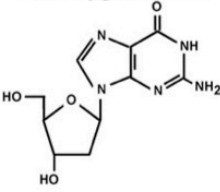
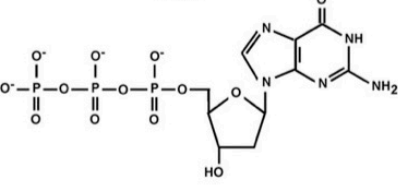
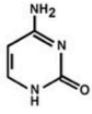
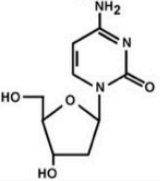
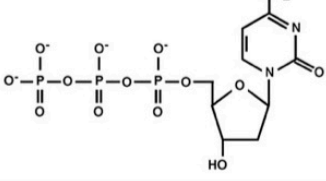
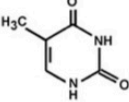
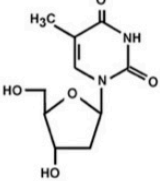
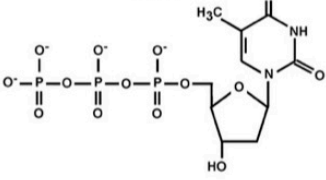
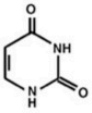
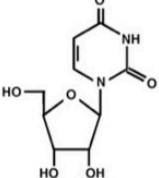
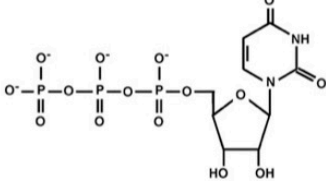
	BASE AZOTÉE	NUCLEOSIDE	NUCLEOTIDE
PURINES	Adénine 	Désoxyadénosine 	dATP 
	Guanine 	Désoxyguanosine 	dGTP 
PYRIMIDINES	Cytosine 	Déoxycytidine 	dCTP 
	Thymine 	Désoxythymidine 	dTTP 
	Uracile 	Uridine 	UTP 

Figure 14 - Composition des nucléotides composant l'ADN et l'ARN.

Le tableau présente les structures chimiques des bases puriques (adénine et guanine) et pyrimidiques (cytosine et thymine (ADN) / uracile (ARN)) constituant les nucléosides (base + ose). Ces nucléosides sont complétés d'un groupement triphosphate en 5' de l'ose pour former les nucléotides.

Grâce à leur chimie, les aptamères ont la capacité de former une structure tridimensionnelle. Cette conformation est le résultat de la combinaison de plusieurs interactions physico-chimique : empilement π - π , interactions électrostatiques, force de van der Waals, liaisons hydrogènes (66). Elles permettent la formation de différents éléments comme des tiges, des boucles, des renflements, des têtes d'épingles, des pseudo-nœuds ou des quadruplexes, conférant la forme tridimensionnelle de l'aptamère. Plusieurs éléments peuvent être retrouvés au sein d'un même aptamère. Cette conformation tridimensionnelle est l'élément clé du mécanisme d'action des aptamères pour permettre une interaction avec la cible (Figure 15) (67). Les aptamères vont alors se fixer à leur cible par un mécanisme de reconnaissance de forme semblable à celui de l'épitope des anticorps avec leur cible, donnant le surnom d' « anticorps chimique » aux aptamères (65). Ce mécanisme d'action permet une liaison forte au site actif de la cible, à la manière d'une pièce de puzzle (68).

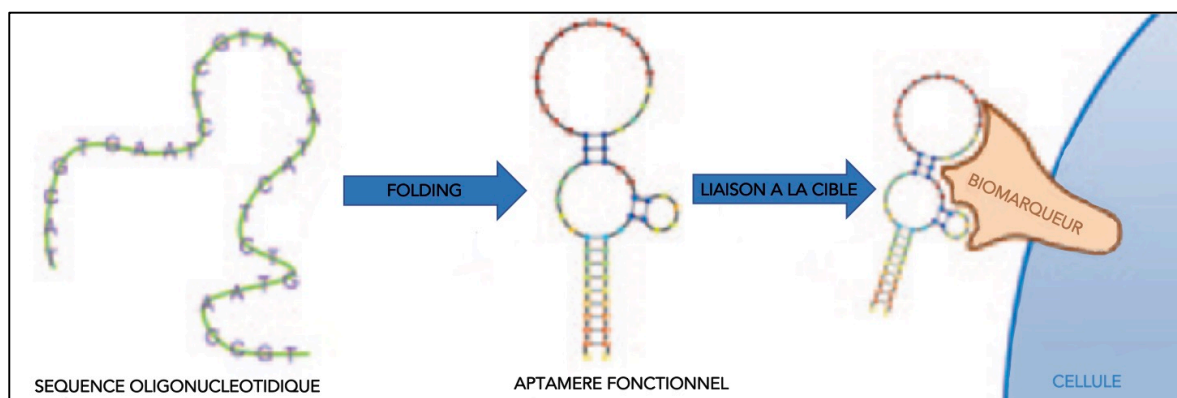


Figure 15 - Représentation schématique de l'interaction d'un aptamère et d'un biomarqueur

La séquence oligonucléotidique peut former plusieurs structures tridimensionnelles dont l'une va pouvoir fixer la cible, dans ce cas, un biomarqueur présent à la surface d'une cellule.

L'interaction entre un aptamère et la cible contre laquelle il a été développé est un équilibre entre différentes conformations de l'aptamère, dont l'une est favorisée en présence de cette cible. Ce mécanisme dynamique de reconnaissance d'une cible a été observé au début des années 2000 dans des riboswitches naturels chez les bactéries. Il s'agit de structures en tige-boucle localisées dans des régions non-codantes d'un ARNm permettant de réguler l'expression de régions codantes (69). Ce phénomène a été décrit chez *Escherichia coli* dans la régulation de la synthèse de la thiamine, ou vitamine B1 (Figure 16) (70). Lorsque sa concentration est trop élevée, le pyrophosphate de thiamine (TPP), un dérivé de la thiamine, se lie à l'ARNm codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse de vitamine B1, et stabilise une conformation « off ». Dans cette conformation, le ribosome ne peut pas interagir et traduire l'ARNm en protéine, inhibant la production de vitamine B1.

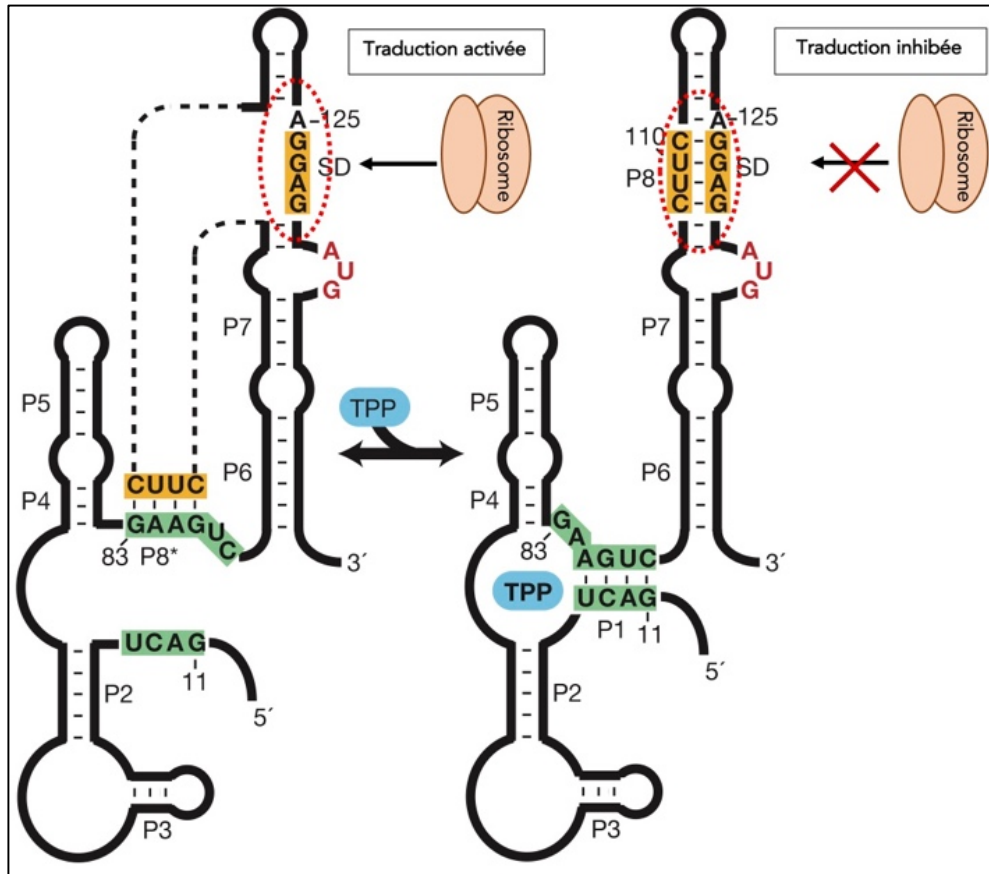


Figure 16 - Riboswitch de l'ARNm codant impliqué dans la synthèse de thiamine

En l'absence de TPP (bleu), la région P8 (jaune) de l'ARNm forme des liaisons avec la partie P1 (verte) : cette conformation libère la région SD, essentielle pour l'interaction avec le ribosome (orange). Dans ce cas, l'initiation de la traduction de l'ARNm est initiée au niveau du codon AUG. En présence de TPP, la région P1 forme une tige libérant la région P8 qui va former une tige au niveau de la région SD. Celle-ci n'est plus accessible par le ribosome et la traduction est inhibée.

Les aptamères sont synthétisés chimiquement, par un protocole automatisé, reproductible et peu coûteux. Ils ont l'avantage d'être chimiquement stable, notamment grâce à leur capacité d'adopter la conformation tridimensionnelle active, même après plusieurs dénaturations par la chaleur. La petite taille des aptamères leur permet une bonne pénétration tissulaire (71) ainsi qu'une bonne clairance par élimination rénale.

2) Applications des aptamères

Les premiers aptamères ont été découverts dans les années 90, par les équipes de Ellington & Szostak (63), de Tuerk & Gold (62) et Robertson & Joyce (72). L'objectif initial des travaux de Larry Gold était de sélectionner des ligands ARN de la sous-unité gp43 de l'ADN polymérase du bactériophage T4. La stratégie consistait à mimer la théorie de l'évolution : les ligands se liant le plus fortement à la forme du site actif de gp43 à la manière d'un riboswitch sont sélectionnés et amplifiés, les autres ligands sont éliminés. Le cycle de sélection est répété de manière à ce qu'à chaque cycle la population de séquences fortement liée augmente en

nombre. Ainsi, l'équipe de Gold est la première à employer la méthode SELEX permettant de sélectionner des ligands ARN ayant une forte affinité et une haute spécificité pour leur cible (62). Par la suite, des aptamères ont été développés en chimie ADN : ils sont plus stables dans le sérum (30 à 60 minutes) que les aptamères ARN (quelques secondes) (73). La nature des cibles est devenue de plus en plus variée (protéines (74), métaux lourds (75), bactérie (76)). Les aptamères acquièrent le statut d'outil théranostique, défini comme un unique système permettant le diagnostic et la thérapie d'une pathologie, simultanément dans le temps et l'espace (Figure 17) (77).

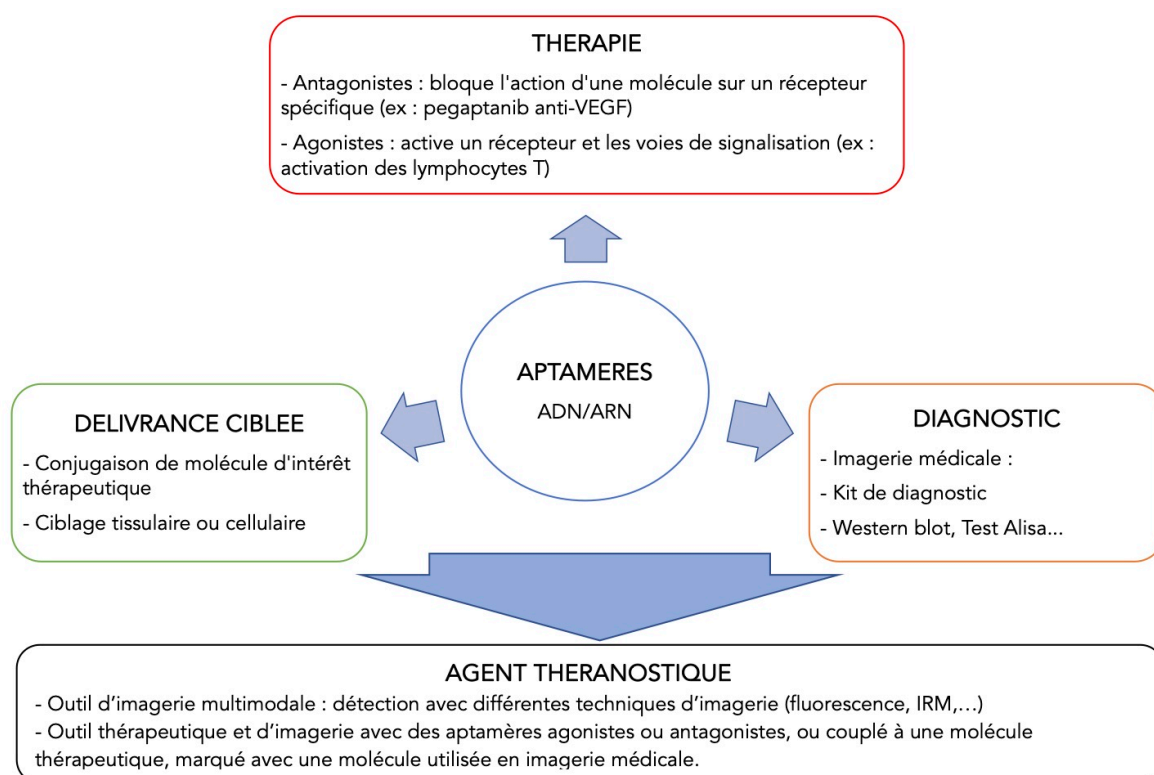


Figure 17 - Champs d'application possibles des aptamères en diagnostic et thérapie

Les champs d'application des aptamères sont la thérapie, le diagnostic et la délivrance ciblée de molécule active. Les croisements entre chaque champ d'application confèrent aux aptamères un statut d'agent théranostique.

Thérapie

Le premier aptamère développé dans un objectif thérapeutique est le pegaptanib (78). Développé par NeXStar Pharmaceuticals®, il est approuvé par la FDA en 2004, et commercialisé par EyeTech Pharmaceutical aux Etats-Unis et par Pfizer ailleurs dans le monde, sous le nom commercial MACUGEN® (79). Le pegaptanib est un aptamère dirigé contre le facteur VEGF (anti-vascular endothelial growth factor). Il est indiqué dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Dans cette pathologie, le VEGF induit une sur-activation de l'angiogenèse dans l'œil, menant à une perte progressive de la vision chez le

patient. Le pegaptanib se fixe au VEGF, empêchant la liaison de ce dernier à son récepteur présent à la surface des cellules endothéliales ; l'angiogenèse est inhibée. Mais cet aptamère est en compétition (d'un point de vue commercial) avec d'autres biosenseurs ayant le même pouvoir inhibiteur de l'angiogenèse :

- Le bevacizumab, un anticorps monoclonal se liant au VEGF, (AVASTIN®), développé pour une indication dans le traitement du cancer.
- Le peptide cyclo(DKP-RGD), qui se fixent aux récepteurs du VEGF (80) et empêchent la fixation du facteur de croissance.

Actuellement, plusieurs aptamères sont en cours de développement préclinique et clinique dans le traitement de différentes pathologies (Tableau II) (78). Parmi ces aptamères, AS1411 et NOX-A12 sont développés comme des molécules thérapeutiques en cancérologie.

Tableau II - Liste non-exhaustive d'aptamères en phase clinique

Le tableau contient la dénomination de l'aptamère, la cible, l'indication pur obtention de l'AMM, et la phase clinique. Deux aptamères sont développés en cancérologie : AS1411 ciblant la nucléoline et NOX-A12 ciblant les récepteurs aux cytokines CXCL12.

Dénomination	Cible	Indication	Phase clinique
EYE001	VEGF	Maculopathie	2/3
		Maladie de von Hippel-Lindau	1
E10030	PDGF	DMLA	2
Pegaptanib	VEGF	Cœdème maculaire diabétique	2
AS1411	Nucléoline	Leucémie Myéloïde Aigue	2
ARC1779	Domaine A1 FvW	Maladie de Willebrand / Purpura / Thrombocytopénie	2
REG1	Facteur IXa	Maladie coronarienne	2
NOX-E36	CCL2	Maladie inflammatoire chronique	1
NOX-A12	CXCL2	Leucémie Lymphoïde Chronique	1
ARC19499	TFPI	Hémophilie	1
ARC1905	C5	DMLA	1

Diagnostic

Depuis plusieurs décennies et jusqu'à aujourd'hui, les anticorps sont l'outil de choix dans la pratique du diagnostic médical (81). Par leur mécanisme d'action proche des anticorps (65), les aptamères pourraient devenir une alternative pour les méthodes diagnostiques.

En 2006, un test semblable au test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a été développé en utilisant un aptamère (82). Nommé ALISA (Aptamer-Linked ImmunoSorbent Assay), l'objectif du test est la détection de l'antigène de la bactérie *Francisella tularensis*, responsable de la tularémie chez l'Homme, potentielle arme biologique à des fins terroristes. Comme dans un ELISA, le test ALISA repose sur un principe de sandwich (Figure 18). L'étude de 2006 permet une comparaison avec un test ELISA, et démontre l'efficacité et la spécificité du test ALISA pour l'antigène bactérien.

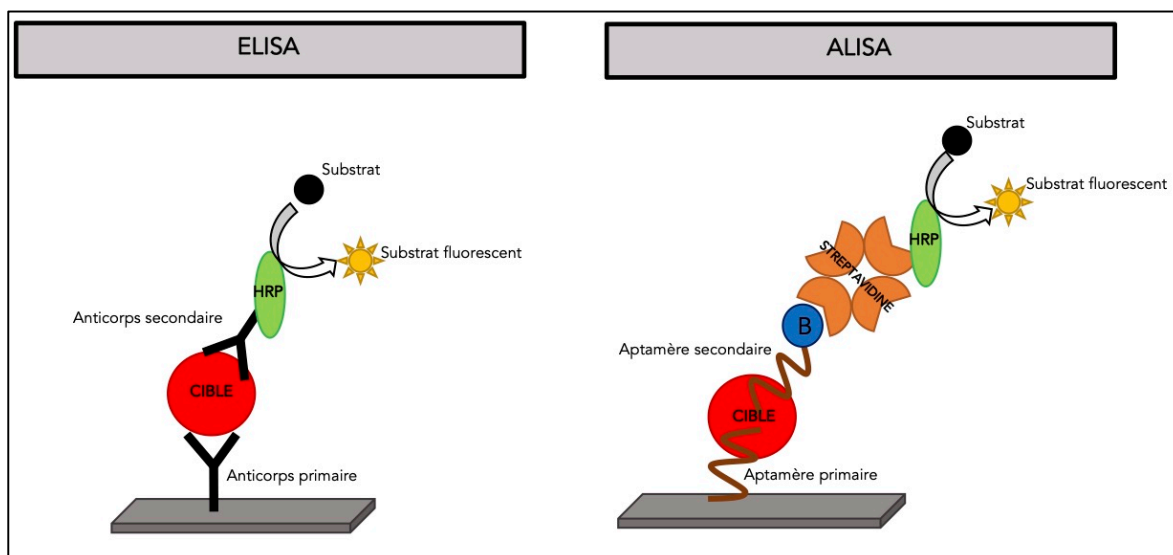


Figure 18 - Comparaison des principes du test ELISA et du test ALISA

Le test ELISA (à gauche) utilise deux anticorps (Ac) : un Ac primaire immobilisé sur une surface et un Ac secondaire couplé à la peroxydase de raifort (en anglais : horseradish peroxidase = HRP). Le test ALISA (à droite) utilise deux aptamères : un primaire immobilisé sur une surface et un secondaire couplé à une molécule de biotine (B). La biotine est ensuite reconnue par une streptavidine couplée à une HRP. Dans les deux tests, il s'agit d'un test sandwich : la cible est immobilisée à l'aide de l'élément primaire, puis l'élément secondaire vient reconnaître la cible immobilisée. Un substrat de l'HRP permet de révéler la présence de la cible.

Grâce à leur faible poids moléculaire, les aptamères présentent ces deux paramètres nécessaires pour une utilisation en imagerie médicale *in vivo* : une bonne pénétration tissulaire et une élimination rapide dans l'organisme. De plus, leur synthèse par réaction chimique permet des modifications post-sélection telle que le greffage de molécules utilisées comme marqueur de détection dans l'imagerie médicale.

L'aptamère ARN nommé F3B, développé pour cibler les MMP9 humaines, a montré son intérêt dans le ciblage des cellules tumorales dans le mélanome cutané (83). La biodistribution de F3B est étudiée par une technique de tomographie par émission monophotonique (TEMP ou SPECT en anglais). Des éléments radioactifs ^{99m}Tc -MAG et ^{111}In -DOTA sont alors greffés sur F3B, permettant d'observer le tropisme de l'aptamère pour les cellules tumorales. L'imagerie *in vivo* par fluorescence est également effectuée sur des souris de la lignée A375 présentant un mélanome. Pour cet objectif, l'aptamère F3B est marqué avec le fluorophore Cyanine-5 (Cy5-F3B). Ceci a permis d'observer la spécificité de F3B pour les cellules tumorales, et également de révéler une accumulation de l'aptamère dans des organes d'intérêt pour le métabolisme et l'élimination des médicaments tel que les reins et le foie. Une étude antérieure avait permis de démontrer la capacité de F3B à fixer les MMP9 humaines dans d'autres types de tumeurs comme le méningiome, le lymphome et le glioblastome (84).

3) Méthode de sélection par SELEX

La méthode SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) est une méthode de sélection *in vitro* d'aptamères utilisant des cycles itératifs de sélection et d'amplification (Figure 19). La sélection est faite à partir d'un ensemble de séquences oligonucléotidiques, composant la banque initiale. Ces oligonucléotides sont obtenus par synthèse chimique. Leur séquence est composée de trois régions distinctes : une région variable entourée de deux régions fixes en 5' et 3'. Les régions fixes permettent l'ancrage d'amorces aux extrémités 5' et 3' lors de l'étape d'amplification par PCR (85). La région variable est une séquence dont la composition est aléatoire, d'une taille préalablement définie, généralement entre 30 et 40 nucléotides. La diversité théorique, soit le nombre de séquences différentes dans la banque, dépend de la taille de cette fenêtre aléatoire (62). Chacune de ces séquences a la capacité de former des conformations tridimensionnelles particulières (63).

L'objectif de chaque cycle est d'éliminer les séquences les plus faiblement liées à la cible d'intérêt et de conserver les séquences les plus fortement liées (86). Pour assurer la spécificité et l'affinité des séquences candidates retenues, deux types de sélection sont effectuées. La première étape est une étape de contre-sélection, ou sélection négative, dirigée contre une cible (protéine, cellule ou petite molécule) proche en structure de la cible d'intérêt. Les séquences fixées à cette cible de contre-sélection ne sont pas spécifiques de la cible d'intérêt, et sont éliminées. La deuxième étape est une étape de sélection positive : les séquences candidates sont incubées avec la cible d'intérêt. Les séquences non fixées à cette étape sont éliminées par

lavage, et les séquences fixées sont récupérées pour être amplifiées par PCR. L'amplification permet d'augmenter la quantité de séquences d'intérêt au sein du pool de sélection. A chaque tour, l'élimination des séquences les plus faiblement liées à la cible permet d'augmenter l'affinité global du pool pour la cible.

Une première moitié du produit de sélection amplifié est conservé pour des études de caractérisation. La deuxième moitié est utilisée pour le cycle de sélection suivant. Une méthode SELEX conventionnelle peut enchaîner jusqu'à 20 cycles de sélection (85).

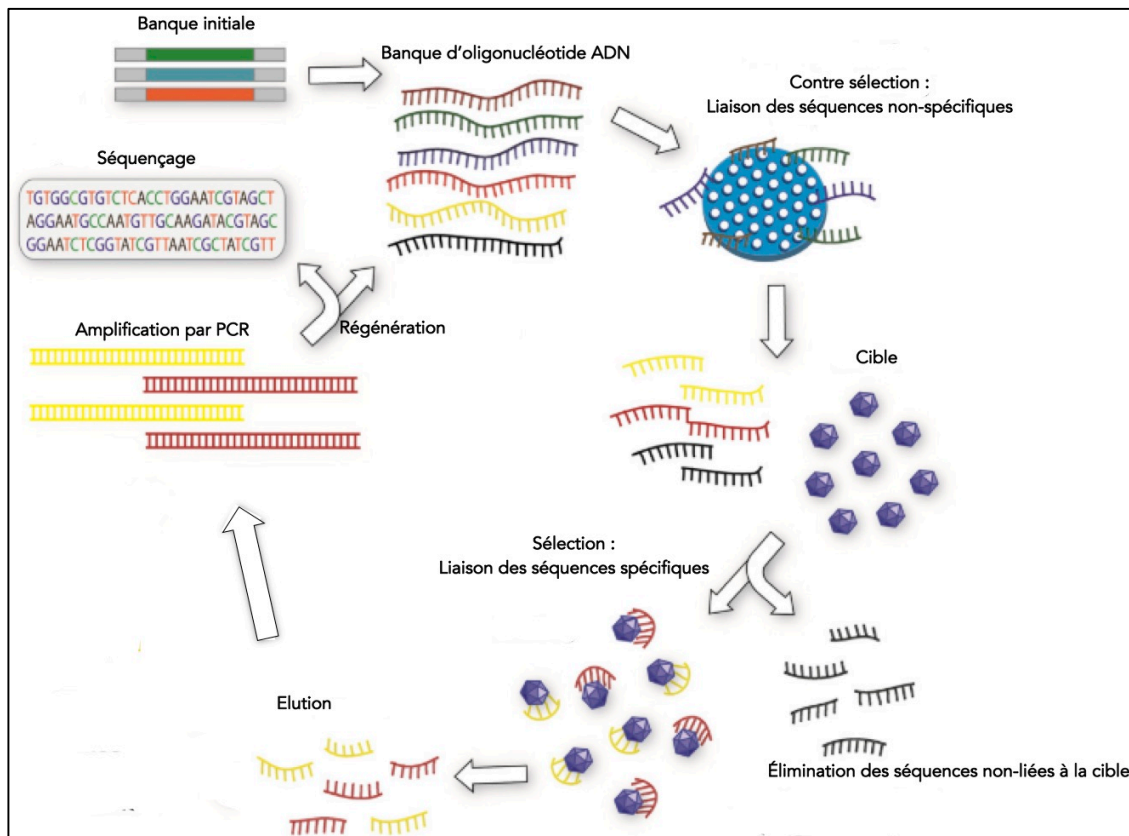


Figure 19 - Schéma des étapes d'un cycle de sélection par méthode SELEX dite « conventionnelle »

Le cycle débute à partir d'une banque de séquence ADN issue d'une banque initiale. Elles sont mises en contact avec l'élément de contre-sélection (protéine, support, ...) : les séquences fixées sont non-spécifiques de la cible d'intérêt et sont éliminées. Les séquences restantes sont incubées avec la cible d'intérêt : les séquences non-liées sont éliminées de la sélection. Les séquences d'intérêt sont extraites du complexe qu'elles forment avec la cible, puis amplifiées par PCR. Une partie est séquencée, l'autre partie est utilisée pour le cycle de SELEX suivant.

La difficulté principale de la sélection est la séparation entre les bons candidats et les mauvais. Plusieurs supports de la cible peuvent être envisagés, de façon à éviter une reconnaissance liée à une conformation particulière de la cible sur un support particulier. Nous allons aborder les trois types de SELEX utilisés au cours de la partie expérimentale de cette thèse. Chacun utilise un support différent pour immobiliser les cibles de contre-sélection et de sélection ou pour séparer les séquences fixées et les séquences non-fixées.

a. *Beads-SELEX*

Le premier beads-SELEX ou microbeads-SELEX (MB-SELEX) (Figure 20) a été décrit par l'équipe de John G. Bruno en 1997 (87). Au cours de cette méthode, la cible d'intérêt est immobilisée sur une microbille magnétique, par réaction chimique à l'aide d'une molécule « linker ». Différentes techniques d'immobilisation ont été développées, notamment une technique reposant sur la forte liaison entre deux molécules : la streptavidine et la biotine (88). Ces nouvelles techniques permettent d'immobiliser une plus large variété de cible. Ainsi, cette dernière peut être une petite molécule chimique (comme un composé polluant aromatique dans le SELEX de John G. Bruno) ou une protéine. Cette méthode permet de faciliter la séparation des complexes cibles-oligonucléotides et les oligonucléotides libres non liés à l'aide d'un séparateur magnétique (87).

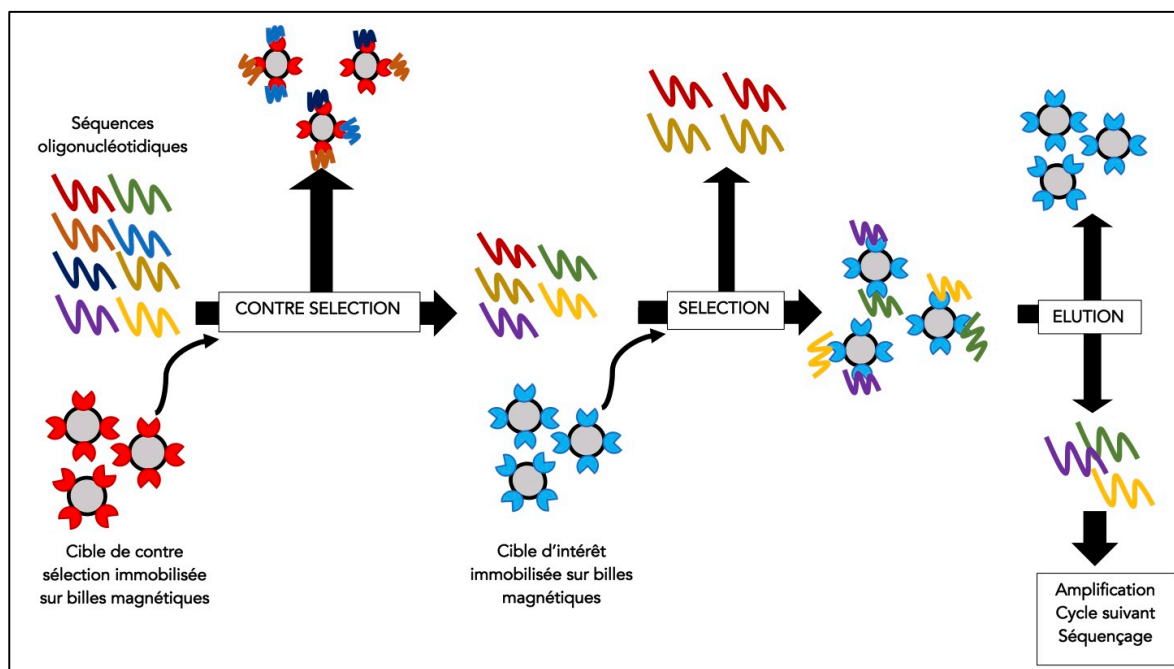


Figure 20 - Schéma d'un cycle de sélection par beads-SELEX

La sélection par beads-SELEX débute avec une partie de la banque d'oligonucléotides. La première étape est la contre-sélection dirigée vers une entité immobilisée sur une bille magnétique. Les séquences liées à cette étape sont éliminées et les séquences non-liées libres sont récupérées. La deuxième étape est la sélection dirigée vers la cible d'intérêt immobilisée sur les billes magnétiques. Les séquences non-liées libres en solution sont éliminées. Les complexes séquences-cibles sont récupérés et les séquences liées sont éluées. Elles sont ensuite amplifiées par PCR. Une partie des séquences est utilisée pour la suite de la sélection et l'autre partie est séquencée.

b. *Filtration-SELEX*

La méthode filtration-SELEX utilise une membrane de nitrocellulose pour séparer les séquences d'intérêt et les séquences libres (Figure 21) (89). Cette méthode de sélection est réservée à un SELEX dont la cible d'intérêt est une protéine, dont la taille est supérieure au diamètre des pores composant la membrane de filtration. Ainsi, le complexe protéine-séquence est retenu à la surface de la membrane activée et les séquences ne présentant pas d'intérêt sont éliminées par lavage. Le premier SELEX élaboré par l'équipe de Larry Gold en 1990 était une sélection utilisant une membrane de nitrocellulose pour séparer les complexes gp43-séquences ARN des séquences ARN non liées (62). La technique de séparation est plus fastidieuse que celle du beads-SELEX, puisqu'elle nécessite une extraction des complexes pouvant s'être adsorbés à la membrane. L'avantage principal est de pouvoir diriger la sélection contre une protéine soluble ou contre le domaine extracellulaire d'une protéine transmembranaire, sans nécessiter son immobilisation sur un support ou l'utilisation de matériel cellulaire vivant. Après le SELEX, ce processus de filtration peut également être utilisé au cours d'essai de quantification de l'affinité des séquences pour la protéine cible (90).

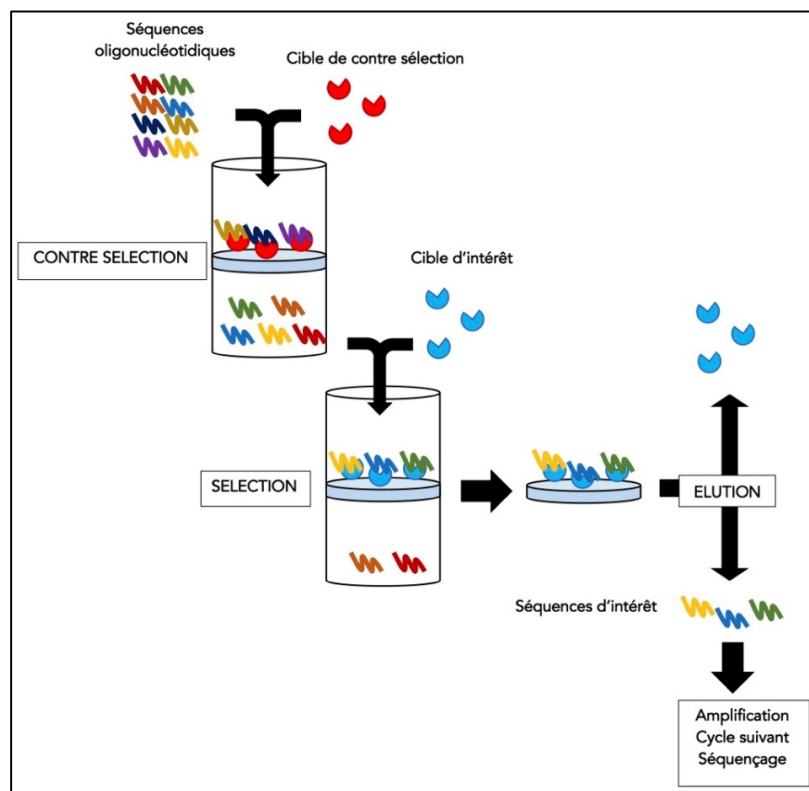


Figure 21 - Schéma d'un cycle de sélection par filtration-SELEX

La sélection par filtration-SELEX débute avec une partie de la banque d'oligonucléotides. Les étapes de contre-sélection et de sélection sont réalisées par incubation des séquences avec les protéines, puis par filtration de la solution à travers une membrane de filtration. Après l'étape de sélection, les complexes séquences-cible présent à la surface de la membrane sont extraits par une méthode d'extraction chimique (ex : extraction par chloroforme-phénol). Les séquences sont séparées de la cible par une étape d'élution. Puis elles sont ensuite amplifiées par PCR. Une partie des séquences est utilisée pour la suite de la sélection et l'autre partie est séquencée.

c. *Cell-SELEX*

La méthode de cell-SELEX permet la sélection de séquences dirigées contre une cellule (Figure 22). L'objectif est de cibler une protéine exprimée par une cellule à sa surface ou un élément intracellulaire par internalisation des oligonucléotides par la cellule (« uptake-based SELEX ») (91). Cette méthode a premièrement été établie par les équipes de D.A. Daniels et L. Gold en 2006 avec la sélection d'aptamères contre la protéine tenascin-C surexprimée à la surface des cellules tumorales de la lignée U251 du glioblastome (92). Par la suite, des aptamères ont été sélectionnés par cell-SELEX dirigé contre des parasites unicellulaires comme les trypanosomes (91) ou des cellules tumorales (93).

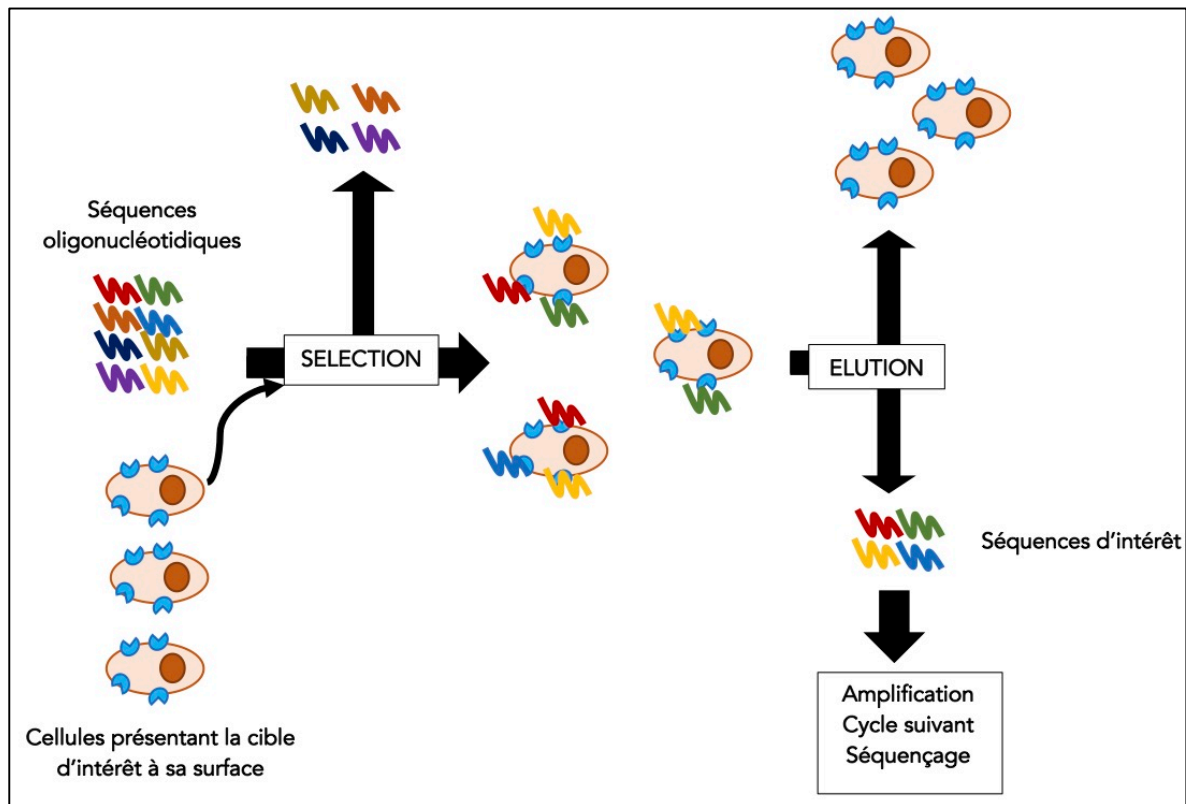


Figure 22 - Schéma d'un cycle de sélection par cell-SELEX

La sélection par cell-SELEX débute avec une partie de la banque d'oligonucléotides. Contrairement à d'autres types de SELEX, il n'y a qu'une étape de sélection contre un type cellulaire particulier ou des cellules exprimant la cible à leur surface. La sélection est faite par incubation de la banque de séquences dans la boîte de culture contenant les cellules. Les séquences non liées sont éliminées après le lavage de la culture cellulaire. Les cellules sont ensuite lysées pour permettre d'extraire les séquences d'intérêt. Elles sont ensuite amplifiées par PCR. Une partie des séquences est utilisée pour la suite de la sélection et l'autre partie est séquencée.

Les trois types de SELEX présentés permettent la sélection dirigée contre différentes conformations de la cible, qui varient selon le support utilisé. Les sélections sur billes et par filtration permettent de cibler des protéines recombinantes, alors que la sélection sur cellules permet de cibler des protéines membranaires dont la conformation est ainsi proche de la conformation *in vivo*. Les avantages et les inconvénients de chaque méthode sont indiqués dans le Tableau III.

Tableau III - Tableau comparatif des trois méthodes de sélection SELEX

Ce tableau récapitule pour chaque type de sélection : la nature de la cible, sa conformation lors de la sélection, la méthode de séparation des séquences, les avantages et les inconvénients.

Méthode SELEX	Beads-SELEX	Filtration-SELEX	Cell-SELEX
Nature de la méthode	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Nature de la cible	De petite molécule à protéine	Protéine	Protéine membranaire Cellule
Conformation	Immobilisée sur la bille	Libre en solution	Native, à la surface membranaire
Séparation des séquences	Séparateur magnétique	Membrane nitrocellulosique	Centrifugation
Avantages de la méthode	Étape de séparation rapide et facilitée	Pas d'étape d'immobilisation	Conformation naturelle retrouvée <i>in vivo</i>
Inconvénients de la méthode	Étape d'immobilisation.	Conformation libre de la cible différente de sa conformation <i>in vivo</i>	Matériel vivant. Présence d'autres cibles potentielles à la surface membranaire.

4) Séquençage à Haut-Débit (HTS : High Throughput Sequencing) du SELEX

Dans les années 1970, deux équipes ont chacune développé une méthode afin de séquencer l'ADN (94). Ces méthodes de séquençage sont depuis un outil majeur en biologie, ayant permis l'identification complète de nombreux génomes. Le premier génome séquencé est celui du bactériophage ϕ X174 DNA par l'équipe de Frederick Sanger, donnant naissance à la méthode de séquençage de Sanger (95,96).

Initialement, les séquences sont amplifiées par clonage dans des vecteurs bactériens (Figure 23a) (97). Les séquences clonées sont récupérées à partir des colonies bactériennes, puis séquencées par une technique par terminaison d'élongation de chaîne à l'aide de didésoxyribonucléotides (ddNTP) (Figure 23b) (96). Les ddNTP sont des nucléotides dont la fonction hydroxyle en C3' de l'ose est substituée par un atome d'hydrogène. Dans la méthode de Sanger améliorée, chaque ddNTP (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) est marqué par un fluorochrome différent. Leur incorporation dans l'ADN en cours de synthèse inhibe l'ADN polymérase et bloque le processus d'élongation. Après l'étape d'élongation, les séquences sont séparées selon leur taille par électrophorèse capillaire. Grâce à la détection des fluorochromes portés par les ddNTP qui ont été incorporés dans le brin d'ADN nouvellement synthétisé, on obtient un chromatogramme permettant de déduire la composition en acide nucléique de la séquence (Figure 23c).

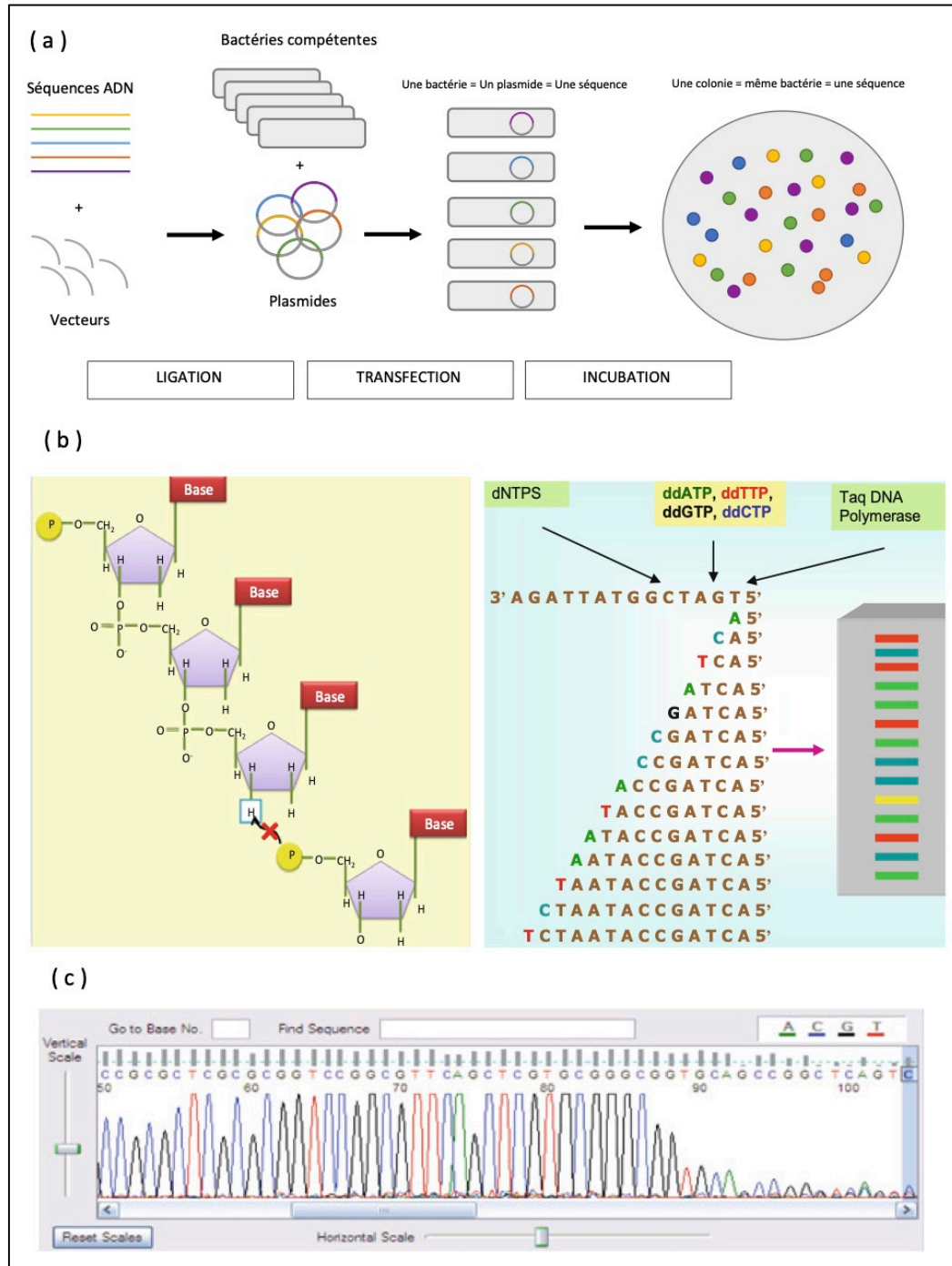


Figure 23 - Clonage et séquençage Sanger

(a) Amplification de la séquence d'ADN par clonage. Le brin d'ADN à séquencer est intégré dans un vecteur plasmidique. Le plasmide recombinant contenant la séquence est intégré dans des bactéries mises en culture. Après incubation et sélection sur milieu de culture, les bactéries recombinantes qui contiennent le plasmide recombinant forment des colonies de clones.

(b) Après avoir purifié le plasmide recombinant à partir des clones bactériens, le fragment d'ADN qu'il contient est séquencé selon la méthode de Sanger à l'aide de ddNTP fluorescents. Le milieu réactionnel comprend une amorce s'hybridant à l'extrémité 5' de la séquence, une ADN polymérase (Taq Pol), des dNTP et les 4 ddNTP fluorescents. La polymérase synthétise le brin complémentaire de la séquence, à l'aide des dNTP. Quand un ddNTP est incorporé dans le brin en cours de synthèse, l'absence de la fonction OH en 3' sur celui-ci ne permet d'insérer le prochain dNTP et conduit à l'arrêt de l'élongation. Les séquences sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, ou par d'autres techniques.

(c) Le chromatogramme obtenu à partir du gel permet de déduire la composition des séquences.

Puis par la suite, de nouvelles méthodes de séquençage à haut débit sont apparues : les méthodes HTS (High Throughput Sequencing) également appelées NGS (Next-Generation Sequencing). Plus rapide que la méthode de séquençage de Sanger, et de moins en moins coûteuses, cette nouvelle génération de séquençages regroupe plusieurs méthodes basées sur diverses approches. Le séquençage Illumina® est la technique de choix dans le cadre du SELEX (98), puisqu'elle permet d'analyser un très grand nombre de séquences (99). Il s'agit d'une méthode de séquençage par synthèse (« sequencing by synthesis » ou SBS) (Figure 24a et b) (100). Les séquences d'intérêt sont immobilisées à la surface d'un support. Le brin complémentaire est synthétisé : l'incorporation d'un nucléotide entraîne l'émission d'une fluorescence, grâce à un fluorophore spécifique de chaque type de dNTP (Figure 24c). Les émissions fluorescentes permettent de déduire la composition des séquences.

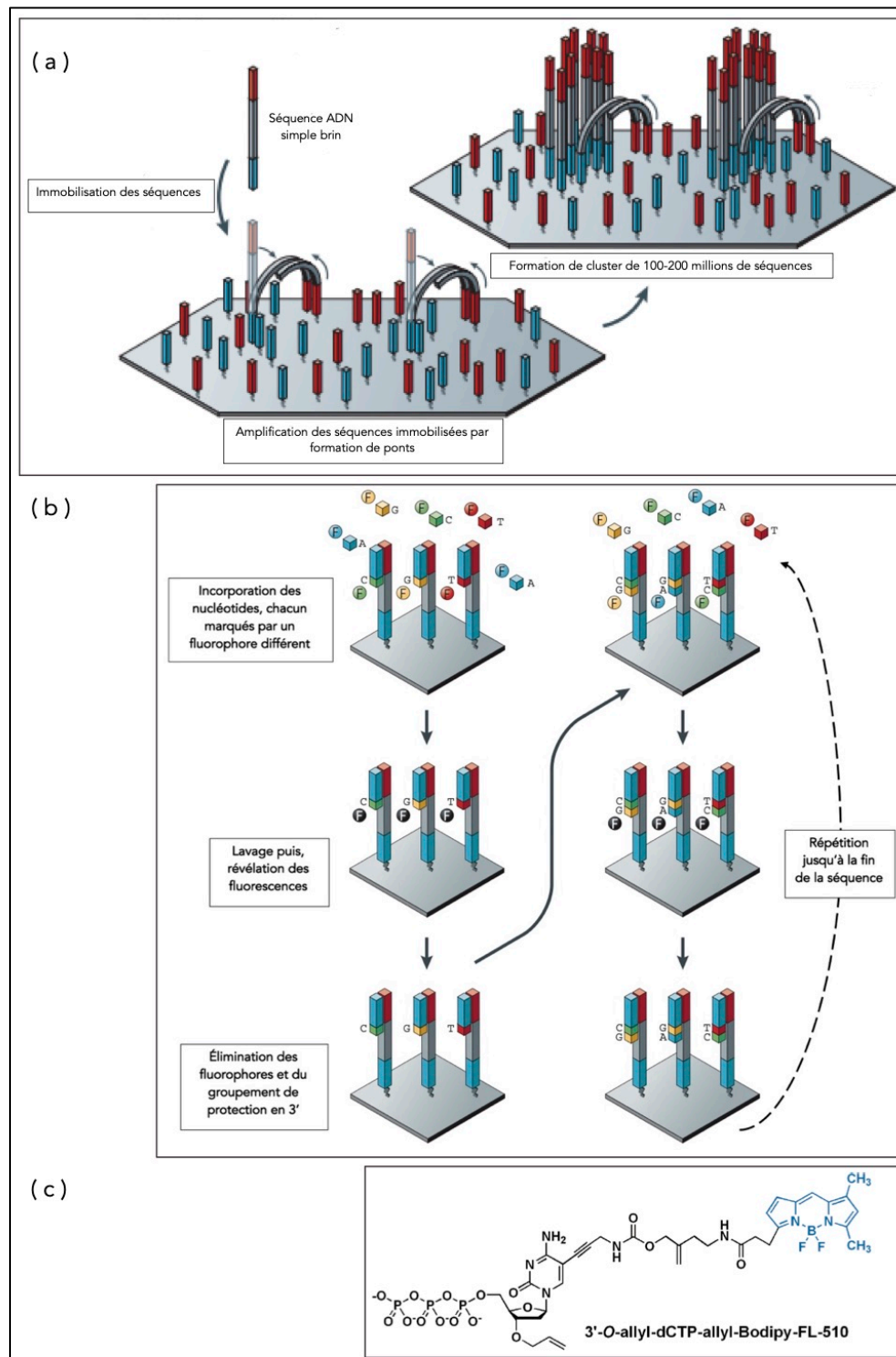


Figure 24 - Principe de séquençage par synthèse utilisé par la plateforme de séquençage Illumina®

(a) Les séquences à analyser (grise) sont flanquées à leurs extrémités par des adaptateurs (rouge en 3' et bleu en 5') et sont immobilisées à la surface d'une puce. (b) Le séquençage est effectué par la synthèse du brin complémentaire avec l'incorporation de nucléotides modifiés. (c) On retrouve la structure chimique classique des nucléotides (pont phosphodiester, ose, base) à laquelle est greffée un fluorophore grâce à un bras clivable lié à la base, et un groupement terminateur en 3' de l'ose, permettant l'incorporation d'un seul nucléotide à la fois. A chaque cycle, les quatre types de dNTP modifiés sont incorporés pour former le brin complémentaire, les nucléotides en excès sont éliminés par lavage puis la fluorescence est révélée. Le groupement terminateur et le fluorophore sont ensuite éliminés, permettant l'incorporation du dNTP suivant. Le cycle est répété jusqu'à la synthèse complète du brin complémentaire.

Les méthodes NGS permettent de séquencer un plus grand nombre de séquences (jusqu'à plusieurs millions de séquences) et plus rapidement que la méthode de Sanger (101). Ces méthodes ont permis d'accélérer, de faciliter et de compléter l'analyse des séquences issues d'une sélection par SELEX, notamment grâce à l'avènement de la bioinformatique (102). Le séquençage des populations de chaque tour permet d'étudier l'évolution du SELEX (Figure 25) (103) : l'enrichissement en séquences, l'enrichissement en motifs, l'impact des paramètres du SELEX, l'apparition de mutations. Cela permet également d'évaluer la diversité de séquences de chaque tour de sélection et l'impact des conditions de sélection (102).

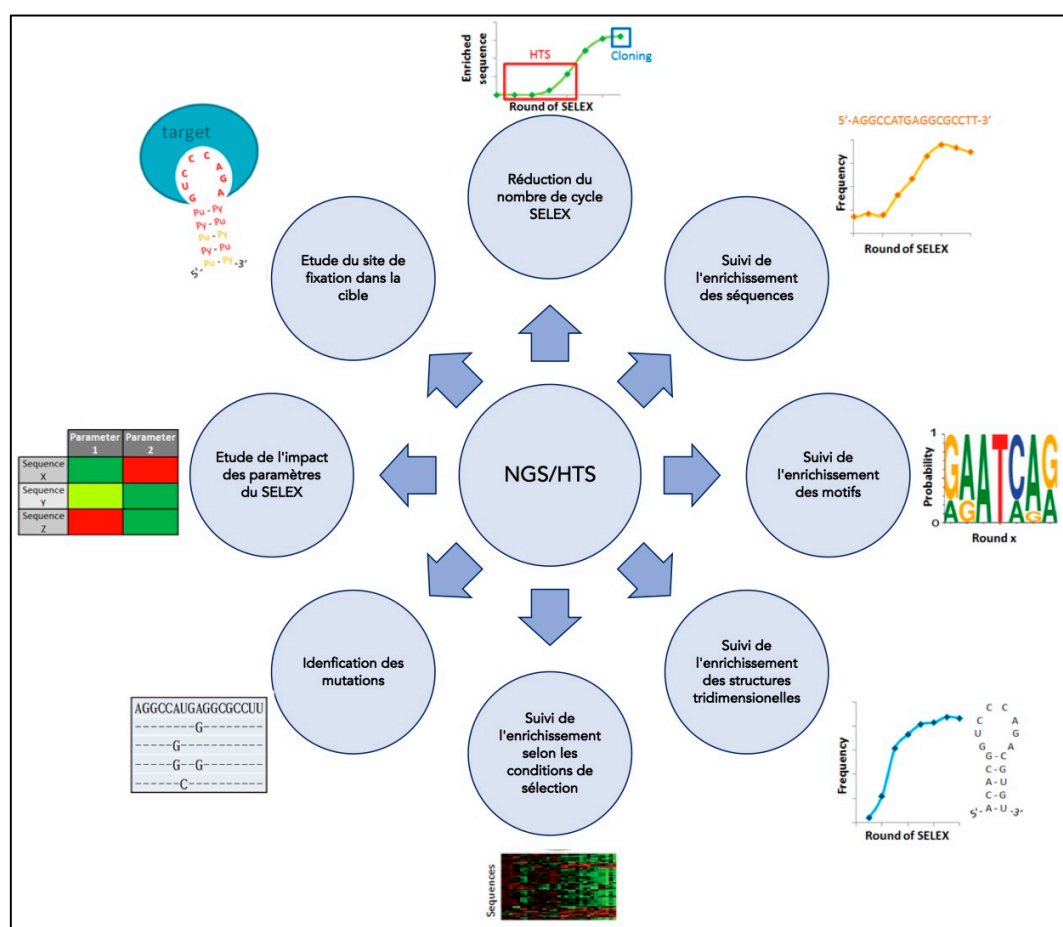


Figure 25 - Apports des méthodes NGS pour la méthode SELEX

L'analyse des données du séquençage d'un SELEX permet : d'observer l'enrichissement en séquences, en motifs et en structure ; de mesurer l'impact des paramètres du SELEX sur l'évolution des séquences ; d'identifier des mutations au sein de familles de séquences ; de caractériser l'interaction entre un aptamère et la cible.

L'analyse des données issues du séquençage est faite à l'aide de logiciels bioinformatiques (103,104). Les critères d'analyse sont dépendants du logiciel utilisé, mais tous permettent d'établir des clusters de séquences basés sur l'évolution au cours du SELEX en termes de nombre de séquences et d'apparition de mutations.

EXPERIMENTATION : Sélection d'aptamères dirigés contre DDR2.

L'objectif est la sélection d'un aptamère dirigé contre la protéine DDR2 par la méthode crossover-SELEX, alternant des cycles par séparation sur billes magnétiques, par filtration sur membrane de nitrocellulose et de cell-SELEX. Ce changement de support permet de s'assurer au maximum que le support n'a pas d'influence sur la reconnaissance de la cible. Les séquences candidates sont ensuite identifiées grâce au séquençage et aux différents outils bioinformatiques. Une sélection de séquences d'intérêt est effectuée, et celles-ci deviennent des aptamères-candidats dont les caractéristiques d'affinité et de spécificité pour la cible sont évaluées.

PARTIE I : Matériels et méthodes**1) Matériels et fournisseurs**

Les oligonucléotides constituant la banque initiale du SELEX sont synthétisés par Eurofins Genomics®. Pour l'amplification par PCR, les amorces sont synthétisées par Eurofins Genomics®. Les polymérases, les tampons et les dNTP sont fournis par différents laboratoires :

- La polymérase GoTaq par Promega®,
- Les polymérases Gold Taq et Phusion Taq, ainsi que le DMSO par ThermoFisher®,
- La polymérase Hot-Star pour préparation au séquençage par Qiagen®,
- Les dNTP par Eurogentec®.

Les produits chimiques suivants sont fournis par Sigma-Aldrich® : l'agarose, les tampons Tris et Tris-HCl, le tampon PBS, la solution de chloroforme:alcool isoamylique (24:1), la solution de phénol (pH8), la solution d'acrylamide à 30%, l'eau pure (dépourvue de nucléases).

Les solutions suivantes sont fournies par Euromedex® : SDS 20%, TBE 10X, TEMED.

Le MgCl₂ est fourni par Fluka®, et l'urée (poudre) est fournie par Biosolve Chimie®.

L'éthanol absolu (EtOH 100%) est fourni par VWR International®, le DPBS 1X par Gibco®.

Les compétiteurs ARNt, BSA et le sperme de hareng sont fournis par Sigma-Aldrich®.

Les tampons utilisés sont décrits dans l'Annexe 1.

Les domaines extracellulaires (DS et DS-like) des protéines recombinantes DDR1 et DDR2, marquée par un tag-histidine, sont fournies par Elabsciences® et Creative BioMart®, dans une solution stérile de PBS (pH 7,4) contenant 5% de tréhalose, 5% de mannitol et 0,01% de tween-80. La protéine recombinante GST-H est fournie par AbCam® et Prospec®, dans une solution stérile de PBS (pH 7,4) contenant 10% de glycérol. A réception, les solutions contenant les protéines sont aliquotées et stockées à -80°C.

Les billes magnétiques en nickel sont fournies par Qiagen®. Les membranes de nitrocellulose (diamètre des pores = 0,45µm) sont fournies par Millipore® et les tubes de filtration Centrex® par Whatman®. Les tubes Lo-Bind utilisés pour la préparation de différentes solutions sont fournis par Eppendorf®.

Les séquences sont amplifiées par PCR dans les thermocyclers SensoQuest®. Les culots contenant les oligonucléotides sont récupérés et séchés par une centrifugeuse sous vide SAVANT SPD111V SpeedVac®. La concentration en oligonucléotides est mesurée par spectrométrie UV à l'aide du nanodrop Denovix®

2) Banques d'oligonucléotides et amorces de PCR

Les séquences ADN de la banque d'oligonucléotides sont composées d'une fenêtre centrale aléatoire de 40 nucléotides flanquée par deux régions constantes en 5' et en 3', nécessaires pour l'amplification par PCR (tableau IV). La longueur totale des séquences est de 87 nucléotides. Les amorces utilisées pour l'amplification PCR sont AP5-F, amorce sens, marquée par la fluorescéine (FAM) en 5', et P3AIC12, amorce anti-sens alourdie, employée pour faciliter la séparation des deux brins synthétisés (Tableau IV).

Tableau IV - Séquences de la banque initiale et amorces de PCR

Les séquences sont constituées d'une région aléatoire (en bleu) flanquée de deux régions fixes (en rouge) permettant l'hybridation des amorces. L'amorce sens AP5F est constituée d'une région permettant l'hybridation (en noir) à laquelle est greffée une molécule de fluorescéine (FAM) en 5'. L'amorce antisens P3AIC12 est constituée d'une région permettant l'hybridation (en noir) et d'une région « alourdie » composée de 20 nucléotides (en vert : motif ACTG) liée à la séquence d'hybridation par un pont de 12 molécules d'éthylène glycol (HO-CH₂-CH₂-OH)(en orange).

Banque d'oligonucléotides utilisés pour le SELEX	
5' GCC TGT TGT GAG CCT CCT GTC GAA N ₍₄₀₎ TT GAG CGT TTA TTC TTG TCT CCC 3'	
Amorces utilisées pour l'amplification par PCR	
AP5F Sens	5' FAM-A GCC TGT TGT GAG CCT CCT GTC GAA 3'
P3AIC12 Antisens	ACTGACTGACTGACTGACTA-C12 -5' GGG AGA CAA GAA TAA ACG CTC AA 3'

La pureté des séquences de la banque est contrôlée à réception, par migration électrophorétique sur gel PAGE à 20% d'acrylamide. Un volume correspondant à 1µg d'oligonucléotide est incubé dans 10 µL de FLB pendant 2 minutes à 90°C puis 5 minutes dans la glace avant d'être déposé sur le gel. La migration est faite pendant une heure à 12 V. La révélation est faite avec une solution de Stains All® (Sigma).

3) Protéine d'intérêt (DDR2) et protéine de contre sélection (DDR1 et GST)

La protéine DDR2 est la cible thérapeutique d'intérêt utilisée pendant les étapes de sélection. Lors des cycles sur billes et par filtration, il s'agit du domaine extracellulaire de la protéine recombinante (les domaines DS et DS-like) DDR2. Son poids moléculaire est de 44,1 kDa. Lors des cycles de cell-SELEX, la protéine transmembranaire DDR2 est surexprimée à la surface de cellules HUVEC (105), cultivées par l'équipe de Frédéric Saltel, à l'Université de Bordeaux.

Les protéines DDR1 et GST ont les protéines utilisées pour les étapes de contre-sélections lors des cycles sur billes et par filtration. Pour DDR1, il s'agit du domaine extracellulaire (les domaines DS et DS-like) de la protéine recombinante DDR1. Son poids moléculaire est de 45,7 kDa. La protéine GST a un poids moléculaire est de 28 kDa.

Toutes les protéines sont marquées par un tag-histidine permettant de les immobiliser à la surface des billes magnétiques.

4) Sélection par méthode de crossover-SELEX

La méthode de crossover-SELEX allie différents types de sélection SELEX : sélection sur billes magnétiques en nickel (beads-SELEX), sélection par filtration sur membrane de nitrocellulose (filtration-SELEX), et sélection contre des cellules HUVEC surexprimant DDR2 (cell-SELEX). La sélection est effectuée sur 14 cycles, alternant 7 cycles de beads-SELEX, 5 cycles de filtration-SELEX et 2 cycles de cell-SELEX.

La première étape de chaque cycle est la mise en structure ou « folding » pour s'assurer que chaque séquence puisse former une structure tridimensionnelle stable. Les séquences sont dénaturées à 75°C pendant 5 minutes, puis immédiatement refroidie dans la glace à 4°C pendant 10 minutes. Elles sont ensuite stabilisées pour la suite du cycle par ajout d'une solution tampon de fixation composée de PBS à une concentration finale de 1X. Le premier cycle de sélection débute avec un aliquot de la banque d'oligonucléotides décrite précédemment.

a. *Beads-SELEX***Immobilisation des protéines de sélection et contre sélection sur les billes magnétiques.**

Les billes sont lavées trois fois avec 20 μ L de PBS-T (1X) dans 10 μ L d'une solution contenant les billes. Le surnageant est éliminé à chaque lavage. Les billes sont ensuite incubées avec la quantité nécessaire de protéines à immobiliser pendant 1 heure, sur une roue agitatrice à la vitesse de 5 rpm, à température ambiante. Le surnageant est éliminé et les billes sont à nouveau lavées avec 20 μ L de PBS-T (1X) afin d'éliminer les protéines non-immobilisées.

Contre-sélections dirigées contre DDR1 et GST.

Les séquences ADN préparées sont incubées avec les protéines de contre sélection immobilisées sur billes magnétiques pendant 30 minutes sur une roue agitatrice à température ambiante. Les billes magnétiques sont ensuite immobilisées à l'intérieur du tube à l'aide d'une barre métallique et les séquences d'intérêt présentes dans le surnageant sont récupérées. Le surnageant contenant les séquences d'intérêt est utilisé pour une autre étape de contre-sélection contre une autre protéine ou pour l'étape de sélection contre DDR2.

Sélection dirigée contre la protéine cible DDR2.

Le surnageant contenant les séquences d'intérêt, récupéré après les étapes de contre-sélection, est incubé avec la protéine DDR2 immobilisée sur billes nickel-NTA, sur une roue agitatrice (5 rpm) à température ambiante. Après incubation, le surnageant, contenant les séquences non-liées à DDR2, est éliminé, laissant les complexes protéines-séquences d'intérêt sur les billes magnétiques. Les billes présentant les complexes protéines-séquences sont à nouveau lavées avec une solution de PBS-Mg (1X).

Élution des séquences d'intérêt.

L'objectif est de séparer les séquences d'intérêt formant un complexe avec DDR2. Après ajout de 100 μ L d'eau stérile, le tube contenant les billes est chauffé à 75°C pendant une minute. Les séquences perdent leur structure tridimensionnelle et se retrouvent à l'état linéaire dans le surnageant. Les billes ne comportant plus que la protéine DDR2 sont maintenues avec la barre magnétique, et le surnageant est transféré dans un autre tube.

b. *Filtration-SELEX*

Contrairement au beads-SELEX, lors des étapes de contre-sélection et de sélection du système de filtration-SELEX, les protéines ne sont pas immobilisées mais libres en solution. Les membranes de filtration utilisées sont composées d'acétate et de nitrocellulose, dont la taille des pores est de 0,45 µm. Pour les étapes de contre-sélection, des tubes Centrex® contenant ces membranes sont utilisées, permettant de récupérer le filtrat contenant les séquences d'intérêt. Pour l'étape de sélection, des membranes circulaires (HAWP, Millipore) sont utilisées dans la chambre sous-vide, permettant de récupérer les complexes séquences-cible par extraction de la membrane.

Équilibration des tubes Centrex® nitrocellulose pour les contre-sélections.

La membrane de nitrocellulose des tubes de centrifugation est équilibrée avant utilisation par addition de 150 µL de KOH (0,5 M) pendant 15 minutes à température ambiante. Les tubes sont centrifugés pendant 12 minutes à 1500g puis la membrane est lavée trois fois avec 150 µL d'eau. La membrane est incubée avec 100 µL de tris-HCl (100 mM, pH 7,5) pendant 1h30. Enfin, pour éviter son assèchement, 500 µL de PBS (5X) sont ajoutés jusqu'à utilisation pour une contre sélection.

Équilibration des membranes de nitrocellulose pour la sélection.

Les membranes de nitrocellulose doivent être traitées avec une solution alcaline (106). La membrane est incubée dans une solution d'hydroxyde de potassium KOH à 0,5 M, pendant 25 minutes à 25°C. Elle est ensuite lavée trois fois avec de l'eau purifiée. Puis, la membrane est lavée dans une solution de Tris-HCl à 100 mM (pH 7,5) et stockée dans la même solution pendant au moins 45 minutes à 4°C.

Préparation des séquences.

Les séquences sont préparées comme décrit précédemment. Contrairement au beads-SELEX, un compétiteur des séquences est ajouté à la solution : l'ADN de sperme de hareng.

Contre-sélection dirigée contre la membrane de nitrocellulose.

La solution d'oligonucléotides est incubée 30 minutes à température ambiante sur la membrane des tubes Centrex®. Le tube est ensuite centrifugé à 500g pendant 5 minutes, et le filtrat contenant les oligonucléotides non fixés est récupéré pour les étapes de contre-sélection contre les protéines.

Contre-sélections dirigées contre DDR1 et GST.

La solution d'oligonucléotide est incubée 30 minutes à température ambiante avec la quantité définie de protéine GST dans un tube Eppendorf® DNA Low Bind 1,5 mL. La solution est transférée sur la membrane du tube Centrex® puis le tube est centrifugé à 500g pendant 5 minutes, et le filtrat contenant les oligonucléotides non fixés est récupéré. Le même protocole est effectué avec la quantité définie de protéine DDR1. Le filtrat, contenant les séquences non fixées, est ensuite utilisé pour la sélection contre DDR2.

Sélection dirigée contre la protéine cible DDR2.

Les séquences sont incubées avec la quantité définie de protéine cible DDR2 pendant 20 minutes à température ambiante sur une roue d'agitation tournante. La solution est filtrée sur une membrane de nitrocellulose dans la chambre sous vide. La solution est déposée au centre de la membrane circulaire de nitrocellulose et la pression négative est activée jusqu'à ce que la membrane soit sèche. Les séquences non-liées passent au travers de la membrane, les complexes séquences-DDR2 sont retenus à sa surface. La membrane est lavée un nombre de fois définie avec la solution de PBS-Mg 1X (1 mL). Après chaque lavage, le vide est effectué jusqu'à ce que la membrane soit sèche.

Extraction des complexes oligonucléotides-protéines des membranes en nitrocellulose.

Les complexes adsorbés à la surface de la membrane sont récupérés par extraction au phénol-chloroforme (107). La membrane est découpée en morceaux à l'aide d'un scalpel. Ces morceaux sont incubés pendant 20 minutes à 65°C dans une solution composée de 250 µL d'urée 7 M et de 250 µL de biophénol (tampon Tris, pH8), afin de décoller les complexes oligonucléotide/protéine de la membrane. Le surnageant contenant les complexes est récupéré dans un nouveau tube et 500 µL d'une solution de chloroforme : alcool isoamylique (24 : 1) sont additionnés pour permettre la séparation des séquences fixées et de la cible. La solution est vortexée puis centrifugée pendant 5 minutes à 13300 rpm. La phase aqueuse supérieure d'environ 300 µL, contenant les oligonucléotides, est récupérée (108).

Élution des séquences d'intérêt.

Les séquences sont séparées des protéines par précipitation pendant une nuit à 20°C dans une solution d'acétate de sodium à 3 M (pH 5.3) et d'éthanol absolu. Après centrifugation (30 minutes 13000 rpm, 4°C), le surnageant est jeté et le culot formé, contenant les séquences, est lavé à l'aide d'une solution d'éthanol à 70% puis le tube est centrifugé (15 minutes, 13000 rpm,

4°C). Le surnageant est jeté et le culot est séché sous vide (SpeedVac, 15 minutes, TA). Le culot est resuspendu dans 100 µL d'eau.

c. Cell-SELEX

Préparation des cellules HUVEC.

Les cellules HUVEC DDR2+, exprimant la protéine DDR2, sont cultivées par l'équipe de Frédéric Saltel, à l'Université de Bordeaux. La confluence cellulaire minimale requise dans la boîte de culture pour effectuer la sélection est de 90%.

Préparation des séquences.

Les oligonucléotides candidats sont incubés 5 minutes à 95°C puis 10 minutes dans la glace. La solution est ajoutée à 340 µL d'un tampon de liaison contenant un compétiteur, l'ARNt. La solution est ensuite incubée 5 minutes à 95°C puis 10 minutes dans la glace. Le volume de la solution est amené à 1 mL par ajout de 650 µL de tampon de liaison.

Sélection dirigée contre les cellules HUVEC DDR2+.

La solution d'oligonucléotides est versée sur les cellules, suivie d'une incubation pendant une heure sur un plateau agitateur (10 rpm). Après incubation, le surnageant est conservé dans un tube et les cellules sont lavées avec un tampon de lavage.

Extraction des séquences d'intérêt

Après élimination du tampon de lavage, 500 µL d'eau sont ajoutés dans la boîte de culture. Les cellules sont détachées en grattant la surface à l'aide d'un « cell scraper ». La suspension obtenue est transférée dans un tube de 1,5 mL. L'opération est répétée pour récupérer le reste de cellules contenues dans la boîte. La suspension est incubée 10 minutes à 95°C pour détruire les cellules et donc rompre les complexes oligonucléotides-cellules. La suspension est centrifugée à 13000g pendant 5 minutes, pour former un culot cellulaire. Le surnageant d'environ 1 mL est récupéré et concentré par évaporation au SpeedVac jusqu'à un volume de 100 µL.

5) Amplification des séquences par PCR

A la fin de chaque cycle, les séquences sélectionnées sont amplifiées par PCR. Les polymérases utilisées sont selon les cycles : la GoTaq Polymerase (Promega®), la Phusion et la DiamondTaq (ThermoScientific®). Le mix de réaction PCR est préparé comme décrit dans le Tableau V. Les conditions de PCR suivent un programme nommé « TouchDown PCR » (Figure 26) effectué sur le thermocycler SensoQuest® constitué de deux blocks. Les produit d'amplification sont vérifiés par migration sur un gel d'électrophorèse (Figure 26).

Tableau V - Préparation du mix de PCR pour l'amplification des séquences du SELEX.

Le volume final d'un milieu réactionnel pour réaliser une PCR est de 50 μL .

Composants (concentration)	Volume (1600 μL)
Tampon GC (5X)	330 μL
DMSO (100%)	82,5 μL
Amorce sens AP5F (100 μM)	16,5 μL
Amorce anti-sens P3AIC12 (100 μM)	16,5 μL
Mix dNTP (20 mM)	16,5 μL
Matrice ADN = séquences (1 μM)	80 μL
Polymérase (5 UI/ μL)	33 μL
H ₂ O	Qsp 1600 μL

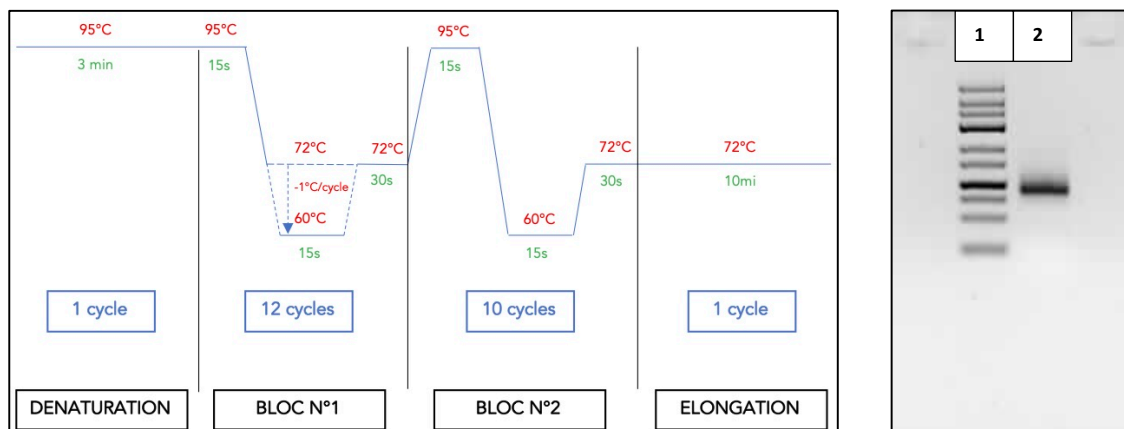


Figure 26 - Programme TouchDown utilisé pour l'amplification par PCR et exemple de gel de contrôle.

À gauche : Le programme de PCR débute par une étape de dénaturation à 95°C pendant 3 minutes. Le bloc N°1 de 12 cycles est composé d'une étape de 15 secondes de dénaturation suivie d'une étape d'élongation de 15 secondes dont la température est réduite de 1°C à chaque cycle, de 72°C au 1^{er} à 60°C au 12^{ème} cycle. Chaque cycle est terminé par une élongation à 72°C. Après le bloc N°1, le bloc N°2 de 10 cycles débute par une étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C puis une élongation de 15 secondes à 60°C. L'élongation finale est faite à 72°C pendant 10 minutes.

À droite : Exemple de gel d'électrophorèse de contrôle du produit de PCR du cycle 7 du SELEX. Dans le puit 1 est déposé un marqueur de taille et dans le puit 2 est déposé le produit de PCR.

Le produit de PCR est contrôlé par migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 3%. Ce contrôle permet de vérifier la taille de l'ensemble des séquences amplifiées. La solution contenant 4 μ L du mix PCR après amplification, 4 μ L d'eau et 2 μ L de tampon de charge, est mise à migrer sur un gel d'agarose à 3% dans un tampon TBE 0,5X pendant 20 minutes, à 100 V. Le gel est révélé sous lampe UV grâce à la présence de bromure d'éthidium (BET) dans le gel.

6) Préparation des séquences pour le tour suivant de SELEX

La solution d'oligonucléotides ADN double brin issue de la PCR est concentrée à l'aide des colonnes Nanosep®10K. Le volume final doit être d'environ 100 μ L. Les brins sens et anti-sens sont séparés par la technique de séparation par amorce alourdie (Figure 27) (109). Les deux brins sont séparés par migration électrophorétique sur un gel dénaturant (110).

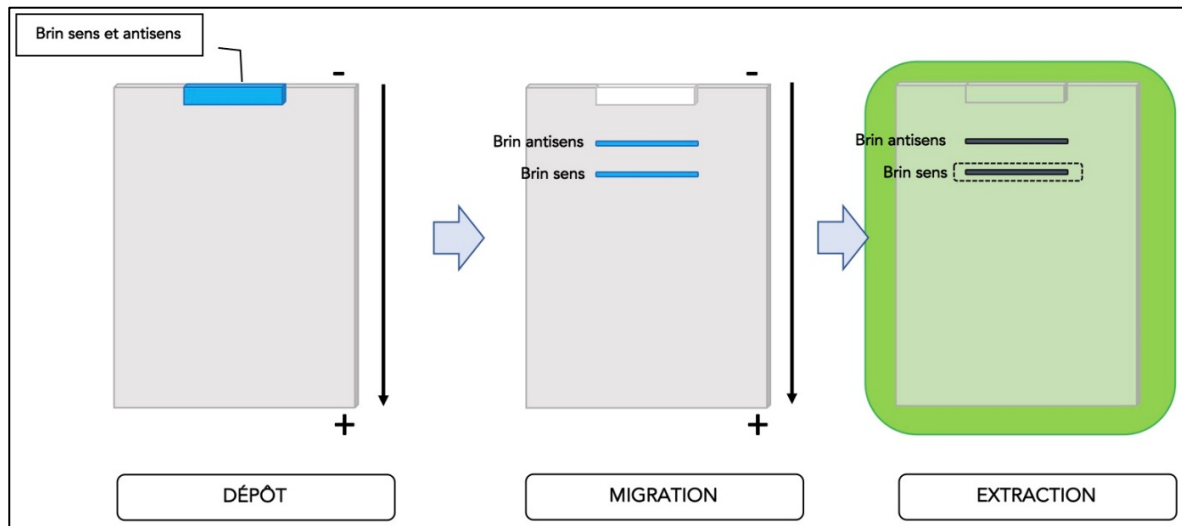


Figure 27 - Principe de séparation de brins d'ADN sur gel par technique de l'amorce alourdie

Les séquences constituées d'ADN double brin sont chargées sur un gel de polyacrylamide PAGE 8%. Les acides nucléiques étant chargés négativement, la migration s'effectue de la borne négative à la borne positive dans un tampon TBE 0,5X à 18 W pendant 2 heures. Le brin anti-sens comportant l'amorce P3A1C12, avec son extension de 20 bases (tableau) migre moins loin que le brin sens (Williams KP, 1995). Après migration, le gel est observé sous lampe UV à une longueur d'onde d'excitation de 254nm (UV shadow), à l'aide d'une feuille de silice F254 Merck, et la bande correspondant au brin sens (environ 88N) est extraite à l'aide d'un scalpel.

Les fragments de gel contenant les séquences d'intérêt sont incubés pendant 2 heures à 65°C dans 1 mL de tampon d'élution TE-NaC. Après incubation, la solution contenant le gel est filtrée sur une colonne CoStar® en réalisant une centrifugation à 13300 rpm durant 10 minutes. Le filtrat est récupéré puis précipité par ajout d'un dixième de volume d'acétate de sodium à 3M (pH 5.2) et trois fois le volume d'éthanol absolu. Les tubes sont ensuite conservés une nuit à -20°C puis centrifugés (30 mn, 13000 rpm, 4°C). Le surnageant est éliminé et le culot formé est lavé à l'aide d'une solution d'éthanol à 70% puis centrifugé 15 minutes à 13000 rpm à 4°C.

Le surnageant est jeté et le culot est séché au SpeedVac pendant 15 minutes à température ambiante. Le culot contenant les oligonucléotides sélectionnés est récupéré dans de l'eau.

La concentration en oligonucléotides (aliquot de 1 µL) est mesurée par spectrométrie UV à une longueur d'onde de 254 nm. Le coefficient d'extinction molaire moyen (ϵ) de la solution est de 869176 M⁻¹.cm⁻¹. La concentration d'oligonucléotide (C) est calculée par la formule : $C \text{ (mol/L)} = A_{254} / \epsilon_{254}$, où A_{254} correspond à l'absorbance de la solution mesurée par spectrophotométrie. La quantité d'oligonucléotides (n) est calculée par la formule : $n \text{ (mole)} = C \times V$, où C représente la concentration molaire en moles/litre et V représente le volume de solution en litres.

La solution d'oligonucléotides obtenue sert de matériel pour différentes utilisations :

- Comme banque d'oligonucléotide pour le cycle suivant de sélection par méthode SELEX.
- Pour les évaluations physico-chimiques de chaque cycle de SELEX.
- Comme matrice pour le séquençage de chaque cycle de SELEX.

7) Identification des séquences candidates sélectionnées

Séquençage par méthode HTS.

Les produits de sélection de chaque tour sont amplifiés par PCR en vue du séquençage. Les tours sont amplifiés en duplicat d'un volume total de 100 µL, composé du mix décrit dans le Tableau VI. La polymérase utilisée est la Hot-Star Taq polymérase. L'amorce anti-sens comporte un index : il s'agit d'une séquence connue de nucléotides fonctionnant comme un code barre pour le séquençage. Chaque cycle de SELEX est associé à un seul et même index. Le programme « PCR NGS » est décrit dans la Figure 28. Le produit de PCR est contrôlé par migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 3% avant l'envoi à la plateforme de séquençage.

Tableau VI - Préparation du mix de PCR pour l'amplification en vue du séquençage.

Composants (concentration)	Volume (100 µL)
Tampon HotStar Taq (5X) + dNTPs	20µL
Amorce sens ForwardA (100 µM)	1µL
Amorce anti-sens Index (100 µM)	1µL
Matrice ADN = séquences (1 µM)	1µL
Hot-Star Taq Polymerase (2,5 UI/µL)	1µL
H ₂ O	Qsp 100µL

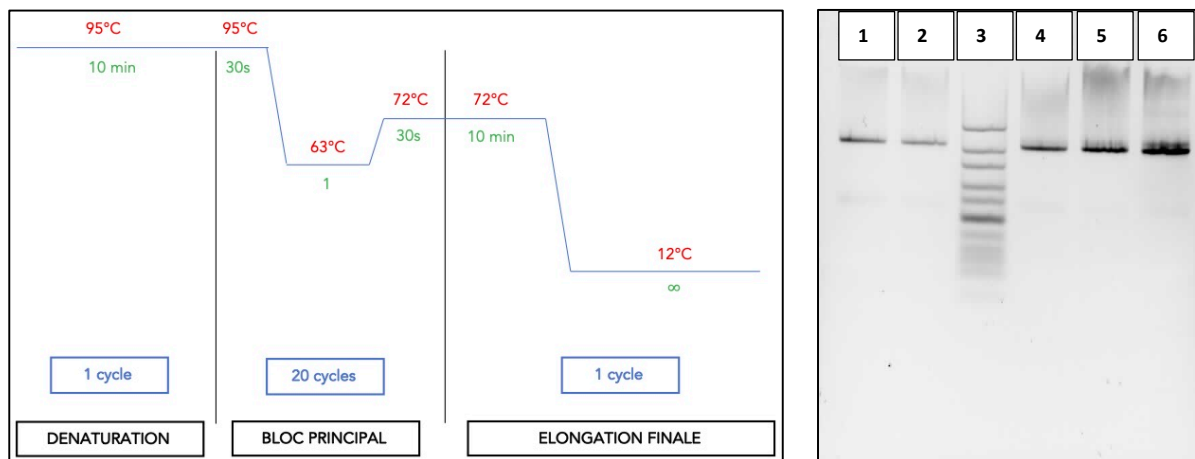


Figure 28 - Programme « PCR NGS » d'amplification PCR des séquences analysées par NGS

A gauche : Le programme de PCR débute par une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 minutes. Le bloc principal est composé de 20 cycles avec une étape de 30 secondes de dénaturation suivie d'une étape d'élongation à 63°C puis d'élongation 72°C pendant 30 secondes. L'élongation finale est faite à 72°C pendant 10 minutes.

A droite : Exemple de gel d'électrophorèse de contrôle du produit de PCR indexé pour le séquençage NGS. Dans le puits 3 est déposé un marqueur de taille. Dans les puits 1, 2, 4, 5 et 6 sont respectivement déposés les produits de PCR des tours SELEX 6, 7, 8, 9 et 10.

Analyse bioinformatique du SELEX.

Les produits de PCR envoyés pour séquençage sont des séquences double brin, contenant l'index identifiant chaque tour de sélection. Le séquençage est effectué sur une plateforme Illumina®, utilisant la méthode de séquençage par synthèse. Les fichiers issus du séquençage correspondant aux cycles de sélection, triés par index, sont reçus au format fastq. A l'aide de la commande cutadapt (python), les séquences sont curées, c'est-à-dire qu'elles sont débarrassées des séquences anormales (trop courtes ou trop longues) et des régions fixes : adaptateurs pour l'immobilisation des séquences sur la puce, index de cycle et régions fixes complémentaires des amorces utilisées lors des PCR du SELEX. Le séquençage est effectué sur les deux brins pour s'assurer que l'intégralité de l'oligonucléotide soit séquencée. L'alignement des séquences permet d'obtenir le fichier d'analyse fastq final comportant un maximum de séquences analysables.

Le logiciel FASTAptamer (python) permet ensuite de déterminer le nombre de copies de chaque séquence (fastaaptamer_count) et de constituer des familles (fastaaptamer_cluster) (104). D'autres commandes python de la base BBMap permettent de définir des taux d'enrichissement (permettant de voir des évolutions rapides de certaines séquences) et de dégager des courtes séquences (motifs) potentiellement importantes car surreprésentées.

PARTIE II : Résultats et discussions

1) Bilan du SELEX dirigés contre DDR2

Le crossover-SELEX est une procédure de sélection alternant différents types de présentation de la protéine d'intérêt. Les trois types de sélection choisis sont le beads-SELEX, le filtration-SELEX et le cell-SELEX. Le principe et les intérêts de chaque approche ont été décrit précédemment. L'objectif est de générer des aptamères spécifiques et affins de la protéine cible, en s'affranchissant des effets de support de la cible. Cette méthode permet la sélection d'aptamères dirigés contre des protéines recombinantes et des protéines membranaires présentes à la surface des cellules dans leur forme native (90). La protéine d'intérêt est la protéine transmembranaire DDR2. Ce récepteur à activité tyrosine kinase a la capacité de se fixer aux fibres de collagènes dans leur état natif de triple hélice (111). Sa surexpression dans les cellules tumorales induit une augmentation de la prolifération et de la migration cellulaire, comme décrit par l'équipe de Zhang sur des cellules HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) (105). Un déficit en DDR2 réduit l'angiogenèse sous-cutanée induite par le VEGF ou par les cellules tumorales.

Le choix du type de SELEX à chaque cycle de sélection est indiqué dans le tableau VII. Le beads-SELEX et le filtration-SELEX sont majoritairement utilisés (respectivement pendant sept et cinq cycles). Le cell-SELEX est utilisé pour deux cycles en milieu de SELEX, il s'agit des cycles 6 et 8. L'utilisation de matériel vivant (les cellules HUVEC), dont la préparation pour obtenir une confluence cellulaire minimale de 90% peut être longue, rend le cell-SELEX plus contraignant que les deux autres techniques (93). Il est également essentiel de vérifier la présence de la protéine DDR2 à la surface membranaire des cellules HUVEC. La stratégie envisagée pour ce SELEX doit prendre en compte ses contraintes, mais également l'impact que peut avoir le changement entre protéine recombinante et protéine native sur la sélection des séquences. Les cinq premiers cycles sont dirigés contre DDR2 sous forme de protéine recombinante afin d'obtenir suffisamment de matériel pour les cycles dirigés contre les cellules HUVEC DDR2+. Les cycles 6 à 9 sont une alternance de cell-SELEX (6^e et 8^e) et de filtration-SELEX (7^e et 9^e). Le premier cycle de cell-SELEX est effectué avec une culture cellulaire de 2,50 millions de cellules, le second cycle de cell-SELEX est effectué avec une culture cellulaire de 1,00 million de cellules. Les cinq derniers cycles de sélection sont de type beads-SELEX.

Les séquences choisies pour initier le SELEX sont issues d'une banque d'oligonucléotides dont les séquences sont constituées d'une fenêtre aléatoire de 40 nucléotides. La diversité de la banque est de 4^{40} séquences, soit 10^{24} séquences différentes. Les régions fixes, pour l'hybridation des amorces lors de la PCR, sont choisies avec la plus petite taille possible : plus leur taille est réduite moins la probabilité que ces régions soient impliquées dans la structuration tridimensionnelle de l'aptamère est grande (112).

Au cours du SELEX, différents paramètres sont modifiés pour augmenter l'affinité et la spécificité des séquences sélectionnées pour la protéine cible DDR2 :

- Augmenter les pressions de sélection permet d'augmenter l'affinité.
- Les contre-sélections permettent d'augmenter la spécificité.

Le crossover-SELEX débute à partir de 2 nmoles de séquences d'ADN issue de la banque d'oligonucléotides décrite précédemment. La banque initiale est composée de 10^{24} séquences uniques, soit une quantité de matière de :

$$n = \frac{N}{N_A} = \frac{\text{Nombre de séquences}}{\text{Constante d'Avogadro}} = \frac{10^{24}}{6,022 \cdot 10^{23}} = 1,66 \text{ moles}$$

Ainsi, le nombre de séquences engagées dans la sélection ne représente que 0,0000000012 % de la banque initiale. La diversité de séquences engagées peut paraître faible en comparaison de la diversité de la banque initiale. Or, le principe de la méthode SELEX est de générer des ligands ayant une forte affinité pour la cible à l'aide de motifs tridimensionnels directement liés à l'évolution de la diversité des séquences : plus la diversité au départ de la sélection est élevée, plus il y a de motifs et de conformations différentes susceptibles de fixer la cible. Pour augmenter la diversité des séquences engagées dans le SELEX et ne pas écarter des séquences d'intérêt présentes dans la banque initiale, la stratégie du SELEX s'appuie sur deux paramètres théoriques. Le premier est l'homologie de formes entre plusieurs séquences : différentes séquences peuvent présenter le ou les mêmes motifs et ainsi les mêmes formes impliquées dans l'interaction avec la cible. La diversité de forme a plus d'intérêt que la diversité des séquences. Par exemple, dans une structure en tige-boucle, seule la boucle peut être impliquée dans l'interaction avec la cible : la composition des parties de séquences formant la tige peut être différentes entre deux séquences mais permettra toujours la formation d'une tige présentant une boucle identique. La deuxième est la survenue de mutations au cours de la sélection. Ce paramètre provient de l'analogie de la méthode SELEX avec la théorie de l'évolution des espèces, émise par Darwin en 1859 (113). Selon la théorie de Darwin, les gènes ancestraux sont

soumis à des facteurs environnementaux qui favorisent le maintien ou l'émergence de nouvelles caractéristiques essentielles à la survie d'une espèce, permettant son évolution de génération en génération. Dans le cas d'un SELEX, les pressions de sélection utilisées favorisent la maintenance des séquences ayant la forme la plus affine pour la cible. Dans les deux situations, la survenue d'une mutation est à l'origine d'une nouvelle caractéristique possiblement bénéfique pour l'évolution d'une entité : seules les mutations intéressantes sont conservées. Au cours d'un SELEX, les mutations sont en fait des erreurs de réplication introduites lors des étapes d'amplification par PCR par des Taq polymérases. L'évolution 'darwinienne' d'un SELEX a notamment pu être mise en évidence grâce aux techniques de séquençage à haut débit et aux analyses bioinformatiques (101). Le SELEX n'est pas un simple processus de tri, mais une méthode impliquant une évolution dynamique des populations de séquences dans l'objectif de produire et sélectionner des séquences les plus affines possibles pour la cible d'intérêt.

Les pressions de sélection sont nécessaires pour éliminer les séquences les moins affines présentes à chaque cycle. Pour cela :

- le ratio entre séquences candidates et protéines cibles est réduit,
- les paramètres de lavage sont modifiés pour augmenter la stringence (114).

La partie de la banque de séquences engagées dans le SELEX est dirigée contre 10 pmoles du domaine extracellulaire de DDR2. Le ratio séquences/protéine au premier cycle est de 200 pour 1 (200:1) et est réduit à un ratio 40:1 lors du quatorzième et dernier cycle par beads-SELEX. Le ratio est inconnu pour les cycles en cell-SELEX, puisque la quantité de récepteur à la surface des cellules est inconnue. Ce ratio est également dépendant de la quantité de séquences obtenue après amplification du cycle précédent.

La stringence est la condition essentielle pour la sélection de séquences de forte affinité (114). Elle est dépendante de la force de lavage, qui est augmentée au cours de la sélection par augmentation du volume et du nombre de lavage. A chaque lavage, les séquences non-liées et les séquences faiblement liées, dont la constante de dissociation K_D est élevée, sont éliminées. Lors des cycles en beads-SELEX et du filtration-SELEX, les lavages sont effectués avec une solution de PBS-Mg (1X). Lors des cycles de cell-SELEX, les lavages sont effectués avec une solution de lavage pour culture cellulaire de DPBS-MgCl₂.

En parallèle, la spécificité des séquences pour DDR2 est assurée par des étapes de contre-sélection dirigées contre DDR1, GST et la nitrocellulose.

La contre-sélection dirigée contre la protéine DDR1 permet d'augmenter la spécificité des séquences pour DDR2 du fait de la similarité structurale de ces deux protéines. Cette contre-sélection n'est pas systématique à chaque cycle du SELEX. Elle n'est pas effectuée lors des cycles impliquant des cellules (6^e et 8^e cycle), du fait que nous ne disposons pas de cellules n'exprimant pas DDR2 (91). Lors du premier cycle, il n'y a pas eu de contre-sélection dirigée contre DDR1, dans le but d'augmenter le nombre de séquences disponibles pour une sélection dirigée contre DDR2.

Les contre-sélections dirigées contre la protéine GST et la nitrocellulose ont pour objectif d'éliminer les biais de sélections liés à l'environnement, c'est-à-dire des séquences ayant la capacité de se lier à des composantes de l'environnement réactionnel (membrane de filtration et linker pour l'immobilisation des protéines).

Certaines séquences oligonucléotidiques ont la capacité de former une structure tridimensionnelle se fixant à des tag histidine (115). Ce tag histidine est présent dans la structure de la protéine GST recombinante que nous avons utilisé. L'étape de contre sélection dirigée contre GST est essentielle pour éliminer les séquences oligonucléotidiques pouvant se lier au tag-histidine, utilisé au cours de la sélection par beads-SELEX pour immobiliser les protéines DDR1 et DDR2 sur les billes magnétiques.

L'étape de contre-sélection dirigée contre la membrane de nitrocellulose a pour objectif d'écarter des séquences retenues par le support. La présence de ces séquences dans le produit final du cycle de sélection provoquerait l'introduction d'un biais sur l'évolution des différentes séquences au cours du SELEX, et peut conduire à la sélection des séquences non-spécifique de DDR2.

Tableau VII - Conditions de sélection du cross-SELEX dirigés contre DDR2

Le tableau indique les conditions de SELEX pour chaque tour : le ratio entre candidats et cible avec la quantité de candidats et de protéines, la nature des contre-sélections et la quantité de protéines introduites pour les contre-sélections et la sélection, le nombre et la quantité de lavage.

Type de cycles		Conditions de SELEX						
		Ratio (Séquences:Cible)	Quantité de séquences (pmoles)	Contre Sélection			Sélection	Lavages (PBS-Mg 1X) (nombre et volume)
				Nitrocellulose ou Billes	GST (pmoles)	DDR1 (pmoles)	DDR2 (pmoles) Cellules (nombre)	
1	Billes	200 : 1	2000	Non	52,5	0	10	2 (100µL)
2	Billes	100 : 1	1000	Non	105	5	10	5 (100µL)
3	Filtration	37,5 : 1	300	Nitrocellulose	105	6	8	3 (1mL)
4	Filtration	37,5 : 1	300	Nitrocellulose	105	6	8	6 (1mL)
5	Filtration	37,5 : 1	225	Non	0	6	6	6 (1mL)
6	Cellules	Non calculable	150	Non	0	0	2500000	3 (1mL)
7	Filtration	30 : 1	150	Non	0	6	5	6 (1mL)
8	Cellules	Non calculable	100	Non	0	0	1000000	5 (1mL)
9	Filtration	37,5 : 1	30	Non	0	0	0,8	6 (1mL)
10	Billes	40 : 1	100	Billes	105	6	2,5	5 (100µL)
11	Billes	40 : 1	80	Billes	105	4	2	6 (100µL)
12	Billes	40 : 1	60	Billes	0	3	1,5	8 (100µL)
13	Billes	40 : 1	40	Billes	0	2	1	10 (100µL)
14	Billes	40 : 1	30	Billes	0	1,5	0,75	10 (100µL)

A l'issue de chaque cycle de sélection, les séquences sélectionnées sont amplifiées par PCR. L'objectif de la PCR est d'augmenter le nombre de copies de séquences d'intérêt pour qu'à l'issue du SELEX, les séquences les plus affines et les plus spécifiques de DDR2 soient également les plus abondantes. Cependant, les polymérases utilisées sont capables d'erreur au moment de l'incorporation d'un nucléotide dans la séquence complémentaire : le taux d'erreur est alors un indicateur de la fidélité d'une polymérase (116). Une erreur de nucléotide ou la délétion d'une base entraîne la survenue d'une mutation dans la séquence (117). Comme expliqué précédemment, ces mutations peuvent être à l'origine d'un gain de diversité essentiel à l'évolution darwinienne du SELEX (118). Mais elles peuvent également faire disparaître des séquences d'intérêt apparues au cours des premiers cycles du SELEX (119).

Plusieurs phénomènes peuvent également menés à la formation de sous-produit de PCR (qui sont des séquences de taille réduite), qui vont s'accumuler au fur et à mesure des cycles du SELEX :

- Les délétions de nucléotides : la survenue de délétion à chaque cycle provoque une réduction de la taille d'une séquence (120).
- La grande stabilité de la structure secondaire des séquences, comme les tiges boucles, peut empêcher la linéarisation de la séquence lors de l'étape d'élongation de la PCR : la Taq polymérase ne peut pas « lire » cette partie de la séquence et la synthèse du brin complémentaire est interrompue (121).
- L'hybridation de deux séquences comportant des motifs complémentaires entraîne la formation de produit chimérique de courte taille (122).

Le dernier problème lié à l'amplification PCR est la facilité d'amplification : certaines séquences sont plus facilement amplifiées parce qu'elles sont plus courtes ou qu'elles contiennent plus de motif G-C (123). Il est alors possible que des séquences d'intérêt moyen soit plus facilement amplifiées que d'autres séquences ayant une forte affinité pour la cible et « polluent » l'évolution du SELEX.

L'étape d'amplification est donc une étape critique du SELEX, dont la maîtrise des différents paramètres (type de polymérase, nombre et longueur de cycle de PCR, température d'appariement) est essentielle pour apporter un gain de diversité tout en essayant de limiter l'apparition de sous-produit d'amplification et la disparition de séquences d'intérêt. Il a donc été décidé d'utiliser différentes polymérases pour l'amplification par PCR à chaque cycle de SELEX. Ainsi, certaines Taq polymérases génèrent plus d'erreurs que d'autres lors de la synthèse d'ADN (117). Les Taq polymérases classiques (comme la GoTaq polymérase) génèrent un taux d'erreurs de l'ordre de 1.10^{-5} (1 erreur sur 100 000) alors que les Taq correctrices d'épreuves (comme la Phusion) génèrent un taux d'erreurs moindre de l'ordre de 1.10^{-8} .

2) Séquences identifiées par méthode NGS.

Le séquençage des oligonucléotides sélectionnés à chaque fin de cycle de SELEX est effectué par la plateforme du Genopole à Évry. Le séquençage à haut débit permet de séquencer des millions de séquences en peu de temps, apportant une véritable avancée dans le domaine des aptamères et pour l'analyse des produits de SELEX (103). La fenêtre aléatoire initiale ayant une longueur de 40 nucléotides, seules les séquences d'une longueur comprise entre 37 et 42 nucléotides sont analysées. Les analyses permettent d'observer l'évolution de la diversité des séquences, c'est-à-dire le nombre de séquence unique par rapport au nombre total de séquence. La diversité au 14^e cycle atteint seulement les 91,3% de la diversité initiale (Tableau VIII). La diminution de la diversité est faible par rapport aux résultats escomptés : lorsque la diversité réduit, cela signifie qu'une unique séquence en grand nombre de copie a une forte affinité et spécificité pour la cible.

Tableau VIII - Diversité des séquences issues du SELEX dirigés contre DDR2

La diversité est calculée comme le nombre de séquences uniques par rapport au nombre total de séquences. Le cycle 0 représente la banque initiale amplifiée. La réduction du taux de diversité au cours du SELEX est trop faible avec seulement 9% de réduction.

Cycle	Nombre total de séquences	Nombre de séquences uniques	Diversité
0	4237948	4220712	99,6 %
1	2124522	2105756	99,1 %
2	1700523	1648217	96,9 %
3	1743768	1721184	98,7 %
4	1756855	1737607	98,9 %
5	1766688	1748941	99,0 %
6	3269073	3254788	99,6 %
7	3558194	3538779	99,4 %
8	2622835	2593860	98,9 %
9	3975317	3911863	98,4 %
10	837761	825240	98,5 %
11	667668	656871	98,3 %
12	850664	834867	98,1 %
13	680680	641899	94,3 %
14	510826	466544	91,3 %

Le profil NGS est analysé et manipulé avec le logiciel FASTAptamer (104). Les candidats sont regroupés en clusters selon leur similarité de séquence. La fréquence et l'évolution des séquences au cours des cycles sont étudiés. On retient les candidats les plus abondants, dont la fréquence augmente au cours du SELEX, en prenant en compte leur évolution selon les types de cycles effectués. Quatre séquences sont alors sélectionnées et nommées D2.1, D2.2, D2.3 et D2.4 (Tableau IX).

Tableau IX - Analyse du séquençage : séquences candidates.

Les quatre séquences les plus abondantes sont analysées, avec le nombre de séquences par millions de séquences totales du cycle 5 au cycle 14. Les séquences D2.2 et D2.3 apparaissent à partir des tours de cell-SELEX (R6 et R8) et partagent trois motifs (bleu). Les séquences D2.1 et D2.4 apparaissent à partir du tour 9 et partagent un motif (rouge).

Cndts	Séquences	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14
D2.2	GCCATCCCGTCAGTCTCAGTCACTCATTGGTGTGTCG	0	0.31	1.41	35.8	23.7	48.9	85.4	74.1	42.6	62.6
D2.3	TATCACCCCGTCAAGTCAGTCAAGGTTGTTGTGTGTCGG	0	0	0	2.29	1.76	9.55	13.5	7.05	10.3	19.6
D2.4	GTCTGTCTGTGCTGTATGTCCCATCTGTTGGTCCACCG	0	0	0	0	3.27	7.16	12	12.9	13.2	19.6
D2.1	TCCCACTTACCTTCTTTGCATCCTTCATGTTGCGGTG	0	0	0	0	1.76	3.58	3	0	2.94	19.6

En alignant les quatre séquences sur la séquence la plus abondante, D2.2, on peut observer la conservation de motifs entre les séquences (Figure 29).

	cov	pid	1 [.	.	.	.]	47
D2.2	100.0%	100.0%	-GCCATCCCGTCAGTC---	TCAGTCACC-TCATTGGTGT-CGT--CG					
D2.3	94.9%	66.7%	TATCACCCCGTCAAG---	TCAGTCAAGGTTGTTG-TGT-CGTG-CG					
D2.4	89.7%	53.7%	----GTCTGTCTGTGCTGTATGTCCCATCTGTTG-CGTCCAC--CG						
D2.1	87.2%	43.9%	----TCCACATTACCT-TCTTTGCATCCTTCA-TGTTCGGTTCG						

Figure 29 - Alignement des séquences sélectionnées par SELEX

En prenant la séquence de D2.2 comme séquence référente, les séquences sont alignées en indiquant le pourcentage de ressemblance dans les motifs identifiés entre les séquences (cov) et le pourcentage de ressemblance sur la totalité de la séquence (pid). Les motifs communs sont indiqués par le code couleur.

Les séquences D2.2 et D2.3 partagent une forte homologie de séquence, ainsi que trois motifs. Les deux séquences sont apparues respectivement au cycle 6 et 8 du SELEX, qui sont dirigés contre les cellules HUVEC DDR2+. Leur fréquence augmente rapidement jusqu'au cycle 10, puis, cette évolution ralentit lors du passage sur des tours sur billes dirigés contre la protéine recombinante DDR2. Ces séquences ont un intérêt particulier parce que leur fréquence est plus élevée lors des cycles de sélection sur cellules avec un récepteur en conditions physiologiques.

Les quatre séquences sont synthétisées par un fournisseur extérieur, dans leur version tronquée, c'était-à-dire la partie comportant uniquement la fenêtre aléatoire d'environ 40 nucléotides. À l'aide de logiciel bioinformatique, il est possible de prédire la structure tridimensionnelle de l'aptamère la plus stable d'un point de vue thermodynamique (124). Cependant cette structure n'est pas obligatoirement la forme « active » de l'aptamère : il est donc difficile de déterminer avec exactitude quelles structures sont impliquées dans l'interaction avec la cible. Lors de la synthèse, une molécule fluorescente est greffée aux séquences pour une évaluation préliminaire du pourcentage de liaison des aptamères à la cible. La mesure de fluorescence est faite grâce à des appareils de spectrophotométrie. Un des essais utilisant la fluorescence est un essai par filtration permettant d'observer la spécificité des séquences pour une cible (Figure 30). Cet essai permet de comparer le taux de fixation d'un même candidat à plusieurs cibles et fournit des informations préliminaires sur la spécificité et l'affinité des séquences pour DDR2.

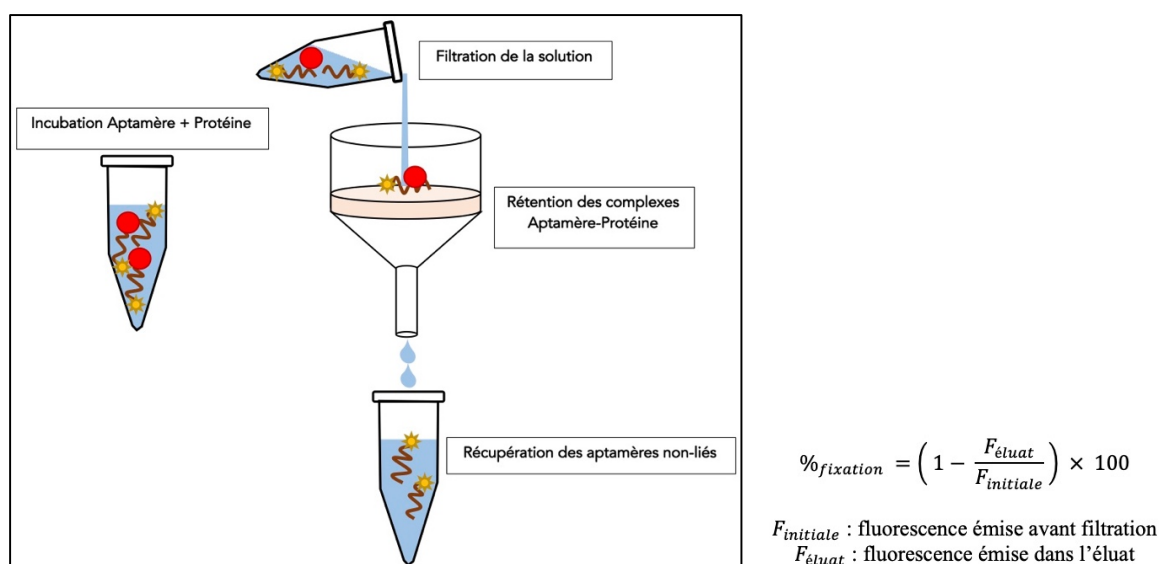


Figure 30 - Essai de liaison par détection de fluorescence

Les séquences candidates marquées par un fluorophore sont incubées avec une protéine : la fluorescence totale émise à cette étape est mesurée grâce à un spectrofluoromètre. Après incubation, la solution est filtrée à travers une membrane de nitrocellulose : les complexes séquences-protéine sont retenus à la surface et les séquences non-liées sont récupérées dans un nouveau tube. La fluorescence émise dans le tube est mesurée et le taux de fixation est calculé grâce à la formule à droite de la figure.

3) Perspectives pour la suite du SELEX dirigé contre DDR2.

a) *Amélioration du produit du SELEX : doped-SELEX*

L'analyse du séquençage des 14 cycles de crossover-SELEX, dirigés contre les cellules HUVEC surexprimant DDR2 et contre la protéine recombinante DDR2, a permis de sélectionner quatre séquences candidates. Deux d'entre elles, D2.2 et D2.3, apparaissent et évoluent rapidement au cours des cycles sur cellules, et deviennent les plus abondantes à la fin du SELEX. Cependant, le SELEX n'a pas fourni les résultats attendus notamment en termes d'évolution générale (faible réduction de diversité) et d'évolution individuelle des séquences (les séquences d'intérêt les plus abondantes ont une fréquence de lecture inférieure à 100 séquences par millions de séquences).

La stratégie adoptée par la suite pour améliorer le produit issu du SELEX dirigé contre DDR2 est d'engager les séquences les plus abondantes, D2.2 et D2.3, dans un type de sélection par SELEX d'une banque de séquence partiellement randomisée appelée doped-SELEX (125). Le principe général de sélection reste identique au SELEX conventionnel : étapes de sélection et de contre sélection, lavage, amplification, séquençage. La banque initiale de séquence aléatoire est remplacée par une banque d'oligonucléotides partiellement randomisée (Tableau X), chaque séquence étant composée d'une fenêtre aléatoire de 40 nucléotides et de deux régions fixes de 24 nucléotides en 5' et 3'. Cette banque randomisée est synthétisée à partir de la séquence tronquée de D2.2 ou D2.3 : à chaque nucléotide, 91% des séquences contiennent le même nucléotide que la séquence de référence, et 9% par les trois autres nucléotides (3% de chaque) (126). Le dopage des banques est de 0,91⁴⁰ % ce qui signifie que 2,3% des séquences de la banque initiale sont identiques aux séquences modèles D2.2 et D2.3.

Tableau X - Banques de séquences utilisées pour le doped-SELEX

Les nucléotides en couleur correspondent à la fenêtre aléatoire. Le code couleur représente la nature du nucléotide dans la séquence de référence (D2.2 ou D2.3).

Doped-SELEX (D2.2)	DD2	<p>GCC TGT TGT GAG CCT CCT GTC GAA – GCC ATC CCG TCA GTC TCA GTC ACC TCA TTG GTG TCG TCG–TTG AGC GTT TAT TCT TGT CTC CC</p> <p>A: 91% A, 3% T, 3% C, 3% G</p> <p>T: 91% T, 3% A, 3% C, 3% G</p> <p>C: 91% C, 3% A, 3% T, 3% G</p> <p>G: 91% G, 3% A, 3% T, 3% C</p>
Doped-SELEX (D2.3)	DD2	<p>GCC TGT TGT GAG CCT CCT GTC GAA – TAT CAC CCC GTC AAG TCA GTC AAG GTT GTT GTG TCG TGC G– TTG AGC GTT TAT TCT TGT CTC CC</p> <p>A: 91% A, 3% T, 3% C, 3% G</p> <p>T: 91% T, 3% A, 3% C, 3% G</p> <p>C: 91% C, 3% A, 3% T, 3% G</p> <p>G: 91% G, 3% A, 3% T, 3% C</p>

La séquence originale (D2.2 ou D2.3) représenterait ainsi 0,2% des séquences totales dans chaque SELEX. L'objectif de cette méthode est d'utiliser la structure de séquence déjà connue comme ligand de la cible comme base d'une nouvelle sélection. Comme il est indiqué dans la Figure 31, seulement une partie des nucléotides sont impliqués dans les structures de boucles et de tiges (127). L'apport des méthodes NGS et de leurs analyses permettent ainsi de visualiser l'impact des mutations au sein des séquences sur leur capacité de liaison à la cible (103). A l'aide de ces SELEX dopés, on peut ainsi espérer générer de meilleures séquences que le crossover-SELEX originel.

b) Évaluations physico-chimiques des aptamères candidats

Après leur obtention par méthode SELEX et la sélection des séquences les plus prometteuses grâce à l'analyse du séquençage, l'interaction entre un aptamère candidat et la cible DDR2 est étudiée à l'aide de techniques analytiques (128). Les évaluations se font de manière générale sur les séquences candidates curées de leurs régions fixes, qui ne sont normalement pas impliquées dans les structures tridimensionnelles (Figure 31).

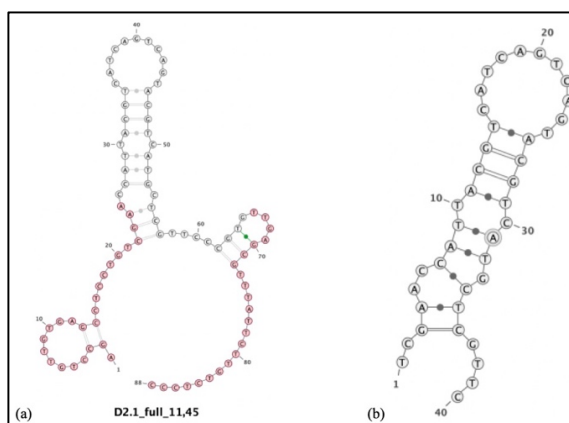


Figure 31 – Exemple de troncation de structure de la séquence D2.1.

A gauche (a), la structure de la séquence entière, mesurant environ 88 nucléotides : on peut voir qu'une partie de la région fixe en 3' de la séquence est impliquée dans une structure en tige boucle. A droite (b), la structure de la séquence curée : la structure tige boucle observée dans la figure de gauche est légèrement modifiée à sa base, mais conserve la structure de boucle possiblement impliquée dans l'interaction avec DDR2.

Cette étape d'évaluation est chronophage et nécessite de nombreuses ressources car l'affinité et la spécificité de chaque aptamère sélectionné doivent être étudiées séparément. Ces techniques peuvent être catégorisées de la manière suivante (129,130) : essais colorimétriques, essais par étude de fluorescence, essais biophysiques, essais sur gel, essais par PCR et modélisation *in silico*. Ces essais vont permettre d'obtenir des informations sur les paramètres d'interactions des aptamères. Les essais par étude de fluorescence permettent une première évaluation en étudiant le taux de liaison et la spécificité des candidats à la cible. Ils nécessitent le couplage d'un fluorophore lors de la synthèse des candidats, ce qui augmente le coût de synthèse. Les essais biophysiques comme la SPR (Surface Plasmon Resonance) (131) et l'ITC (Isothermal Titration Calorimetry) (132) doivent être effectués pour obtenir des données quantifiables telle que la constante de dissociation (K_D), et permettre de caractériser l'interaction entre l'aptamère et la protéine. Les différentes techniques sont comparées dans le Tableau XI.

Tableau XI - Essais biophysiques de caractérisation de l'interaction aptamère-cible.

Le tableau indique la technique, le volume d'échantillon nécessaire, la durée de l'essai, la sensibilité de la technique avec la constante de dissociation limite détectable et le matériel nécessaire.

Technique	Volume	Durée	K _D limite (M)	Matériel nécessaire
Dialyse	100µL	48H	10 ⁻⁸	Dialyseur avec fluoromètre
Filtration	200-500µL	5 min	10 ⁻¹¹ à 10 ⁻¹²	Filtre, centrifugeuse, vide
Électrophorèse sur gel	10 à 50µL	3H	10 ⁻¹³	Autoradiographe
Électrophorèse capillaire (EC)	10µL	10min	10 ⁻⁹	EC automatisé + Détecteur LIP
HPLC	100µL à 18mL	10 à 30min	10 ⁻⁶	HPLC automatisé + Détecteur UV
Fluorescence	150µL	10min	10 ⁻¹⁰	Spectrofluoromètre
Anisotropie	150µL	10min	10 ⁻⁹	Spectrofluoromètre + Cuve en quartz + Polariseur
Absorption UV-Visible	2,5mL	10min	10 ⁻⁶	Spectrofluoromètre
SPR	10-20µL	20min	10 ⁻¹²	Biacore SPR + Puce
ITC	200-500µL	1,5 à 3H	10 ⁻⁸ à 10 ⁻⁹	Calorimètre ITC

HPLC : Chromatographie à haute performance liquide

SPR : Surface Plasmon Resonance

ITC : Isothermal Titration Calorimetry

Une équipe de l'université de Stanford a proposé en 2015, un « workflow » (Figure 32) indiquant les types d'essais de caractérisation, leurs rôles et leurs limites, dont l'objectif est de fournir une méthodologie standard pour sélectionner, optimiser et caractériser des aptamères, plus rapidement, plus facilement et à un coût réduit (133).

CIBLAGE D'UN BIOMARQUEUR PAR UN APTAMÈRE

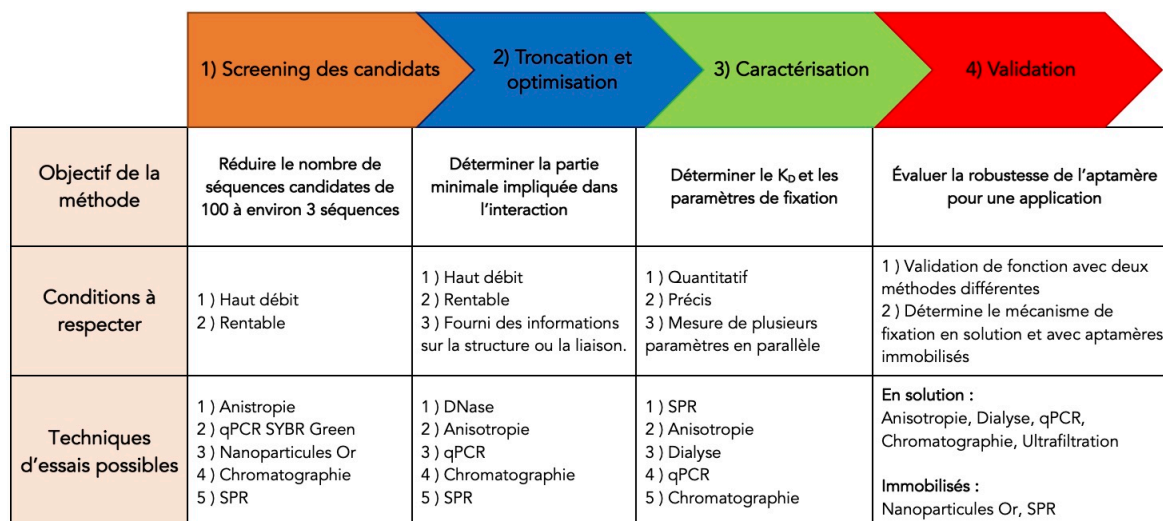


Figure 32 – Workflow du développement d'un aptamère

Le workflow indique les objectifs de chaque étape de développement d'un aptamère et les techniques disponibles pour atteindre l'objectif. La liste des techniques est non-exhaustive.

c) Post-SELEX : stratégies d'optimisation

Les deux principaux obstacles à l'utilisation des aptamères *in vivo* sont leur dégradation par des exonucléases sériques et leur faible biodisponibilité (134). On distingue deux étapes post-SELEX pour surmonter ces obstacles (135) : la troncation et les modifications chimiques.

La première étape consiste à réduire la taille des séquences à l'unique partie impliquée dans l'interaction avec la cible. Pour déterminer cette partie active, on utilise des logiciels bioinformatique comme Mfold, mais également des techniques biophysique comme la spectroscopie RMN ou la cristallographie (136). Cette étape a deux avantages :

- Le coût de la synthèse d'un aptamère est dépendant de sa taille.
- Les aptamères dont la taille est réduite à la seule portion de séquence impliquée dans l'interaction ont une meilleure affinité et une meilleure spécificité pour la cible (137).

La deuxième étape consiste à modifier la structure chimique des nucléotides afin d'augmenter la résistance aux exonucléases sanguines et d'améliorer la biodisponibilité des aptamères dans l'organisme. On distingue trois types de modification selon leur localisation (Figure 33) (138) :

- Les modifications de l'ose en position 2' (pour les aptamères ARN) ou avec des changements de la structure comme les Locked Nucleic Acid (LNA) et les HNA empêchent la reconnaissance de l'aptamère par les exonucléases (139).
- Les modifications de la base par l'incorporation de groupement (en C5 des pyrimidines et en C8 des purines) d'une grande variété (hydrophobe, hydrophile, chargés positivement ou négativement) permettent d'augmenter l'affinité pour la cible. Il est donc nécessaire de connaître les caractéristiques du site de fixation dans la cible grâce aux techniques de spectroscopie RMN ou de cristallographie avant d'effectuer ces modifications (140).
- Les modifications du pont phosphodiester ont pour objectif de protéger les aptamères de la dégradation enzymatique. La modification peut être :
 - Une coiffe (en anglais : « capping ») greffée aux extrémités empêchant l'action d'exonucléases (141). En 3', on peut greffer une biotine ou un nucléotide inversé. En 5', on peut utiliser le greffage de plusieurs entités comme le PEG, le cholestérol, les acides gras ou un nucléotide inversé.
 - Un remplacement des nucléotides non-impliqués dans l'interaction avec la cible par un linker non-nucléotidiques comme le PEG, rendant impossible l'action des nucléases (142).

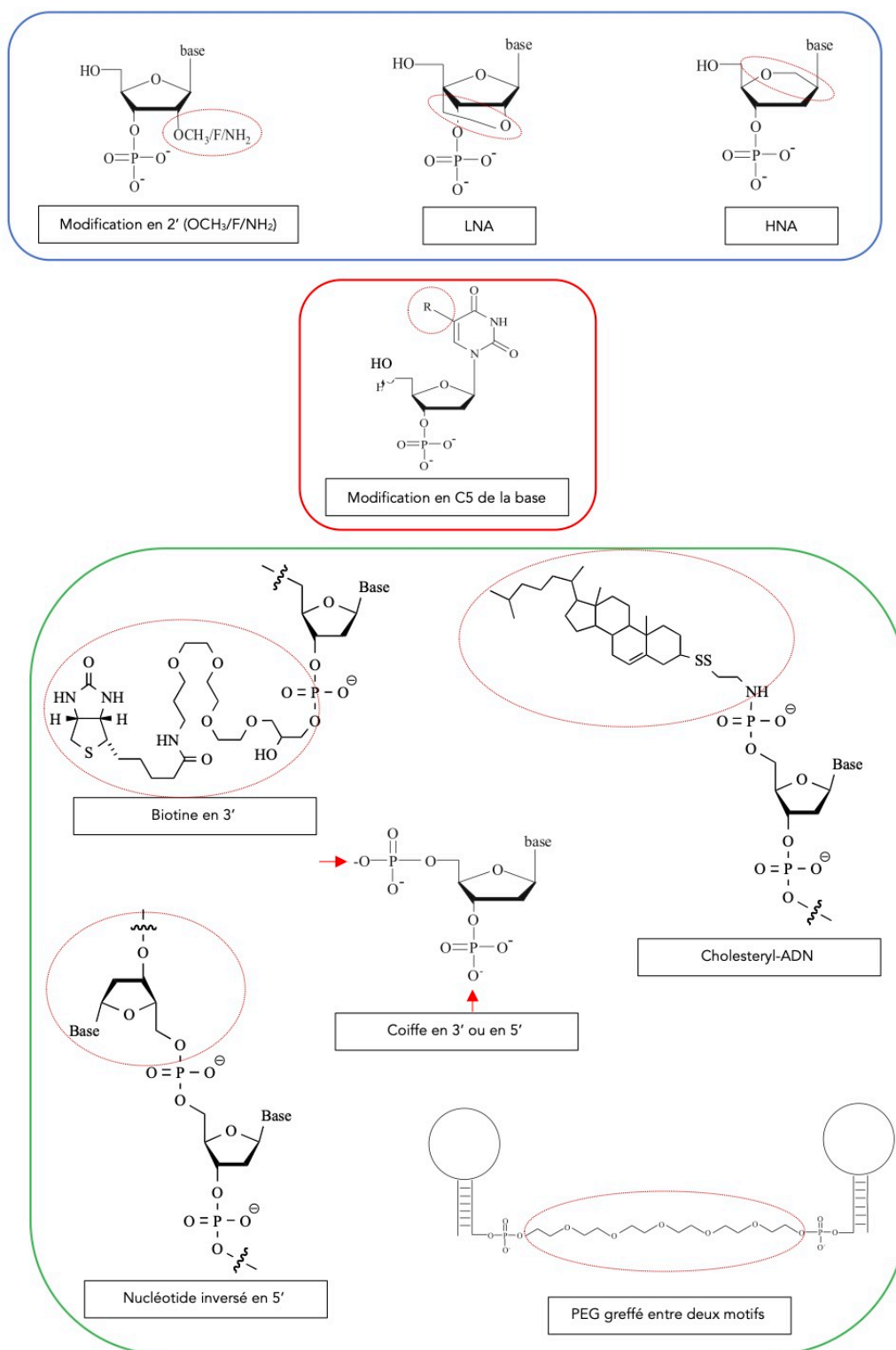


Figure 33 - Modifications chimiques apportées aux nucléotides.

Les nucléotides sont modifiés pour obtenir une résistance aux nucléases ou augmenter la biodisponibilité des aptamères. Des modifications concernant l'ose sont indiquées dans le cadre bleu, celle concernant la base sont indiquées dans le cadre rouge, et celles concernant la liaison phosphodiester sont indiquées dans le cadre vert.

Dans la publication parue en 2017, Sharma et al. détaillent les étapes de la technologie des aptamères, représentées dans la Figure 34 (129). La sélection d'un aptamère en chimie ADN dirigé contre DDR2 est actuellement à l'étape du séquençage des produits du doped-SELEX, utilisant des types de sélection par filtration et sur cellules. Selon l'analyse bioinformatique du séquençage NGS, les séquences les plus prometteuses en termes d'évolution seront sélectionnées, évaluées et optimisées. Il reste donc plusieurs étapes à franchir avant d'obtenir un unique aptamère candidat ayant un potentiel de biosenseur de DDR2.

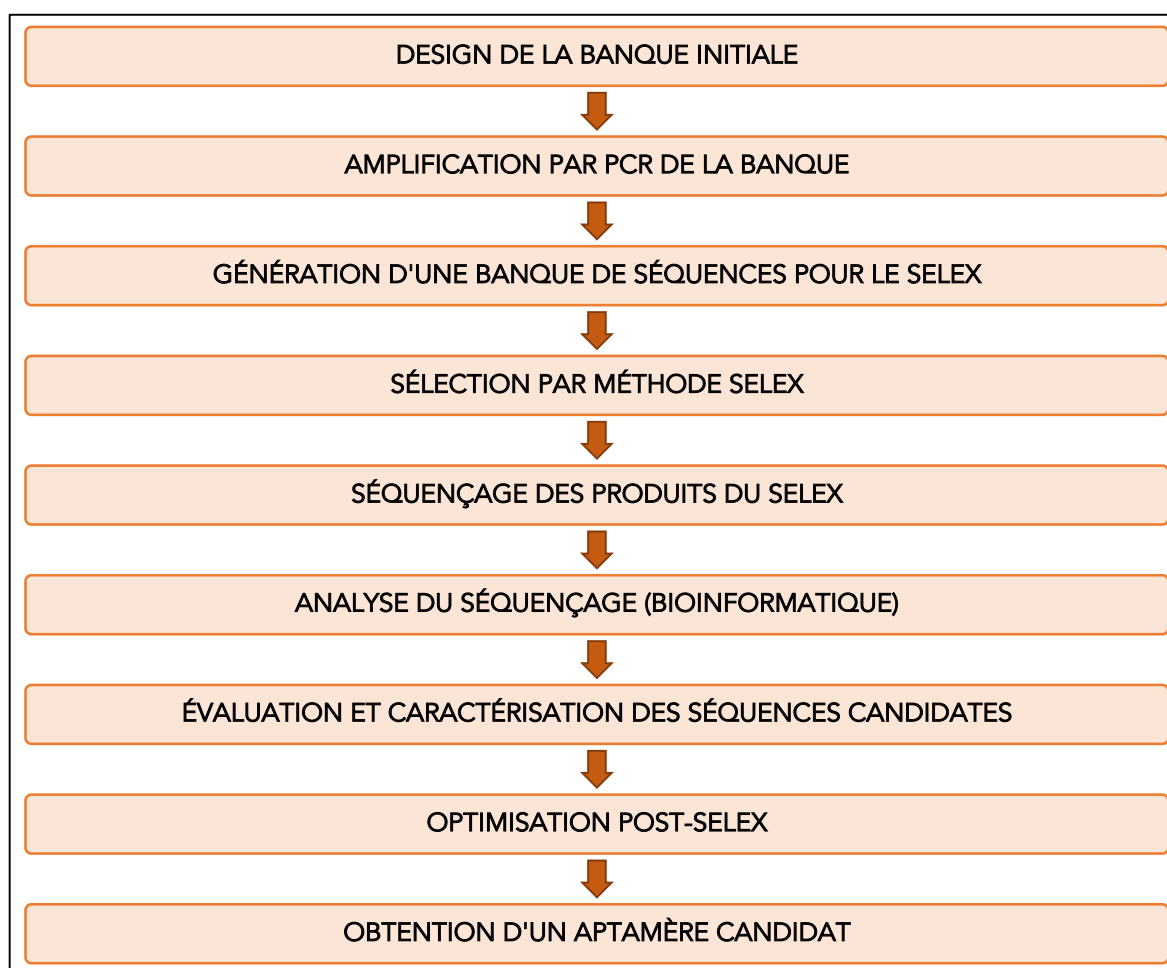


Figure 34 – Étapes de développement d'un aptamère.

Cet organigramme représente les grandes étapes de la conception d'un aptamère, en partant de la conception de la banque initiale jusqu'à l'obtention d'un aptamère optimisé obtenu par une sélection par méthode SELEX.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES : Statut actuel des aptamères, perspectives d'améliorations et futures applications dans le domaine pharmaceutique.

Comparaison entre aptamères et anticorps.

Depuis plusieurs décennies, la lutte contre le cancer est orientée vers la recherche de marqueurs spécifiques des tumeurs pour pouvoir étudier la pathologie, détecter précocement et soigner. Cet objectif a été réaffirmé au cours des années 2000, avec le projet de recherche pour la détection précoce du cancer, le « Early Detection Research Network » (EDRN) initié par l'Institut National du Cancer américain (« National Cancer Institute ») (143). Dans les années 80, plusieurs équipes étudiant le glioblastome découvrent une glycoprotéine membranaire, la tenascin-C (144), dont la surexpression sera par la suite démontrée dans plusieurs types de cancers (145,146). La première initiative pour cibler cette protéine a été le développement d'anticorps monoclonal, dont certains ont été testés en essai clinique (147,148). Grâce à leur mécanisme d'action par reconnaissance de motif à l'aide de leur épitope, les anticorps ont été rapidement utilisés pour le ciblage moléculaire. Mais l'utilisation de ces derniers comme biosenseurs *in vivo* est limitée par leur poids moléculaire qui réduit leur pouvoir de pénétration tissulaire. Parmi les alternatives aux anticorps se trouvent les aptamères. Ainsi, un aptamère dirigé contre la tenascin-C a été développé par méthode SELEX (92). Son rôle de biosenseur a pu être établi grâce à une étude *in vivo* chez la souris (149) : l'aptamère marqué par un élément radioactif (^{18}F et ^{64}Cu) a permis le ciblage de cellules de glioblastome ou de tumeur pulmonaire par tomographie par émission de positon (PET-scan).

L'intérêt de ces aptamères repose sur leurs caractéristiques, combinaison de celles des petites molécules et des anticorps, notamment leur affinité et leur spécificité pour une cible (150). Mais les aptamères présentent également certaines propriétés avantageuses par rapport aux anticorps (Tableau XII).

Tableau XII - Tableau comparatif des caractéristiques des aptamères et des anticorps. (Nimjee S. et al, 2017)

Aptamères	Anticorps
Affinité de l'ordre du nano au picomolaire	Affinité de l'ordre du nano au picomolaire
Processus de sélection chimique <i>in vitro</i> pouvant cibler une grande variété de cibles.	Processus de sélection nécessitant un système biologique (animal), ne permettant de cibler que des cibles non-toxiques et non-immunogéniques pour le système.
Sélection de ligands utilisables dans plusieurs conditions pour le diagnostic <i>in vitro</i> .	Sélection de ligands utilisables uniquement dans des conditions physiologiques.
Sélection par cycles itératifs contre une cible identifiée.	Sélection nécessitant un screening de tous les anticorps produits.
Paramètres pharmacocinétiques modifiables.	Paramètres pharmacocinétiques difficilement modifiable.
La cible est déterminée (ex: choix du domaine de la protéine cible).	La cible est dépendante du système immunitaire de l'animal.
Chimiquement modifiable.	Peu de modification possible.
Thermostable, retrouvant sa structure tridimensionnelle active après étape de folding.	Thermolabile, dénaturation irréversible par la chaleur.
Pas de date limite de conservation après synthèse.	Courte date limite de conservation après production.
Non-immunogène pour le patient.	Immunogène pour le patient.
Possible d'éliminer des ligands responsables de réactions croisées à l'aide des contre-sélections.	Impossible d'éviter des réactions immunologiques croisées.
Développement d'antidote inhibiteur de l'activité de l'aptamère.	Méthode de développement d'un antidote inexistante.

Un aptamère a pour avantage principal par rapport aux anticorps d'être sélectionné à l'aide d'une méthode *in vitro*, indépendante d'un système biologique. Cette méthode permet d'envisager un large choix de cibles, comme les toxines ou les molécules fortement immunogènes pour lesquelles le développement d'anticorps est impossible (151). Un aptamère a ainsi été développé pour la détection de l'ochratoxine A, une mycotoxine alimentaire contaminant les céréales, le café et le vin, et responsable d'un effet néphrotoxique, cancérigène, tératogène et immunotoxique (152). A l'inverse des anticorps, un aptamère a un faible pouvoir immunogène et est facilement modifiable par synthèse chimique, permettant d'optimiser ses propriétés pharmacocinétiques. Ils présentent également des avantages pour une possible production à l'échelle industrielle : ils sont thermostables, leur conférant une longue durée de conservation, et produits par synthèse chimique automatisable, méthode rapide et peu coûteuse, présentant une faible variation entre deux synthèses (153).

La méthode de sélection par SELEX est l'élément clé du développement d'un aptamère. Depuis sa première utilisation en 1990 (62), la méthode a évolué dans le but d'améliorer les performances de sélection et de développement. En 1995, Larry Gold, pionnier de la méthode SELEX, publie un article de synthèse dans lequel il détaille les différents aptamères découverts jusqu'alors. Il conclut ses propos avec des prédictions sur l'avenir du monde des aptamères, et les futurs objectifs que les oligonucléotides pourront et devront atteindre (154) : la possibilité d'améliorer chimiquement les oligonucléotides pour augmenter leurs performances, la capacité de cibler des éléments de plus en plus complexes (globules rouges, cellules tumorales), le développement d'aptamères permettant d'élucider le rôle et la structure de certaines protéines dans des phénomènes physiologiques, et des applications comme les biosenseurs dans le domaine médical et dans la recherche fondamentale.

Cependant, depuis 1990 et la mise en œuvre du SELEX, un seul aptamère a été commercialisé à des fins thérapeutiques : le pegaptanib (Macugen®), dans le traitement de la DMLA. Initialement indiqué en première intention, il a été remplacé par un premier anticorps monoclonal, le bevacizumab, puis par d'autres anti-VEGF tel que l'aflibercept (Eylea®) et le ranibizumab (Lucentis®) (155). Ainsi, malgré la sélection et l'optimisation de nombreux aptamères, peu d'entre eux ont réussi à passer avec succès l'étape des essais cliniques. Si l'échec en phase d'étude clinique est rencontré pour le développement d'autres classes de molécules thérapeutiques, l'absence d'aptamère à ce stade est une source de déception pour ce domaine (156). Ce phénomène peut être expliqué par l'attrait des grandes industries pharmaceutiques pour les anticorps monoclonaux, ayant démontré leurs efficacités depuis de nombreuses années.

Émergence des ligands peptidiques.

D'autre part, l'émergence de la technologie des ligands peptidiques est un compétiteur à l'épanouissement des aptamères dans le domaine pharmaceutique. Le concept de ligands peptides apparaît en 1996 (61), avec comme objectif de fixer la protéine kinase Cdk2 impliquée dans le cycle cellulaire. Ces ligands peptides vont adopter une forme, généralement une boucle, capable de se lier à une cible qui est le plus souvent une protéine. Ils sont sélectionnés par une méthode de phage display (Figure 35) (157) : les peptides sont exprimés à la surface de bactériophages qui sont par la suite mis en contact avec la cible pour sélectionner uniquement les peptides se fixant à elle. D'un point de vue technique, cette sélection est différente de celle

des aptamères, mais la stratégie est identique : l'utilisation de cycle itératif de sélection pour générer des ligands affins et spécifiques d'une cible à partir d'une banque de séquences de gènes comprenant une partie aléatoire amener à évoluer en gagnant en diversité (158,159). Leur analogie avec les aptamères composé d'acides nucléique leur confère la surnom de « peptide-aptamère » (160). Le peptide cyclo-RGD, nommé Cilengitide, est en phase III d'essai clinique dans le glioblastome (80) : son interaction avec différentes intégrines inhiberait l'angiogenèse tumorale en perturbant l'action du VEGF. Grâce à leur production et leur sélection pouvant être effectuées *in vivo*, par exemple chez la levure, les peptides peuvent subir une recapture intracellulaire. Ils présentent l'avantage de pouvoir atteindre des cibles intracellulaires, capacité difficilement retrouvée chez les aptamères (161). Enfin, comme les aptamères, les ligands peptidiques sont modifiés après sélection afin d'optimiser leurs propriétés pharmacocinétiques (158,162).

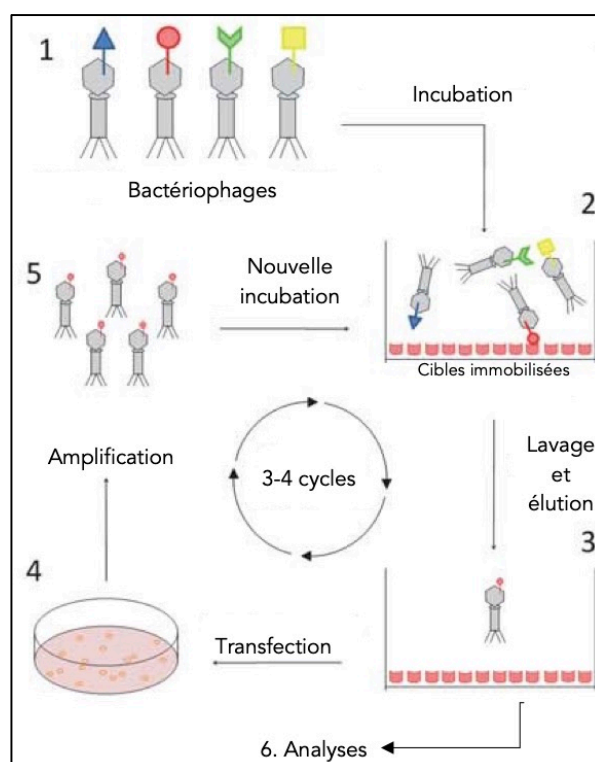


Figure 35 - Représentation d'un cycle de Phage Display

Les bactériophages (BP) sont transformés pour que chacun exprime un unique motif peptidique à sa surface (1). Ils sont ensuite incubés avec la cible d'intérêt (2). Les BP non-fixés sont éliminés par lavage (3). Puis, les BP sélectionnés infectent des bactéries (4), permettant leur amplification (5). Les copies de BP sélectionnés sont de nouveau incubées avec la cible, et les cycles sont répétés (3 à 4 cycles). A la fin du processus, les BP et les motifs peptidiques sont élucidés et analysés (6).

Diversité biochimique : améliorations des propriétés physicochimiques des aptamères.

Contrairement aux peptides et aux anticorps, les aptamères présentent l'avantage de pouvoir fixer des toxines, des métabolites et des molécules comme les polluants. Cette caractéristique leur donne l'avantage dans les domaines analytiques lorsqu'ils sont couplés à des techniques d'analyse déjà établies : SPR, biosenseur électrochimique, chromatographie (163). Les oligonucléotides ont également été manipulés afin de former des nanostructures de détection analytique comme les structures origamis (164), les moteurs moléculaires (165), ou des outils utilisant des capacités riboswitches (166). Mais bien qu'ils soient des outils d'avenir dans le domaine des nanotechnologies et des nanostructures, les aptamères conservent un potentiel d'application comme biosenseur médical grâce à la recherche d'améliorations de leurs structures chimiques et de leur méthode de sélection (167).

Abordés précédemment dans les perspectives post-SELEX de la sélection dirigée contre DDR2, les modifications chimiques des aptamères ont pour objectif d'augmenter la biodisponibilité en conférant une résistance aux nucléases sanguines (73). Par exemple, le pegaptanib, premier aptamère ayant obtenu une AMM thérapeutique, est un aptamère auquel il a été greffé une molécule de polyéthylène glycol de 40 kDa (168) afin d'augmenter le temps de demi-vie de l'aptamère permettant une administration toutes les six semaines (169). Alors que ces modifications sont effectuées en post-SELEX, une autre approche développée est la modification des nucléotides composant les séquences en amont du SELEX. Contrairement aux modifications post-SELEX, celles-ci ne perturbent pas la reconnaissance de la cible. Contrairement à d'autres ligands comme les peptides qui sont composés à l'aide d'une vingtaine d'acides aminés différents, les aptamères sont composés à l'aide de quatre types de nucléotides ce qui limite leur diversité (129). Pour augmenter la diversité, plusieurs équipes ont modifiés les bases nucléiques pour permettre aux aptamères d'adopter de nouvelles conformations (Figure 36) :

- Les Slow Off-rate Modified Aptamers, ou SOMAmer (170) développés par un des pionniers de la méthode SELEX, le Dr Larry Gold et son équipe. En greffant sur sa base un groupement semblable à la chaîne latérale des acides aminés (position 5 des pyrimidines et position 7 des purines), le nucléotide acquiert un caractère hydrophobe permettant de fixer de nouvelles cibles. Mais leur utilisation est limitée par l'efficacité d'incorporation de ce type de base avec les polymérases habituelles utilisées pour les amplifications par PCR, et leur évaluation nécessite de nouvelles techniques d'analyse (171).

- Les Bases Non-Naturelles ou UBP (« Unatural Base Pair ») permettent d'élargir le code génétique en augmentant le nombre de bases disponibles (172).
 - Dans les années 90, l'équipe du Pr Romesberg crée des UBP incorporables lors de la synthèse d'un brin d'acide nucléique par une polymérase (173).
 - L'équipe du Pr Hirao propose l'introduction des UBP dans le design de la banque initiale du SELEX (174). Contrairement aux bases des acides nucléiques naturels, celles-ci sont hydrophobes, permettant de fixer de nouvelles cibles. La même équipe a ainsi pu sélectionner des aptamères se fixant avec succès au VEGF et à l'interféron- γ , avec des affinités de l'ordre du pico au nanomolaire (175).
 - L'équipe du Pr Benner crée un biopolymère dont la structure est proche de celle de l'ADN : l'AEGIS, pour « Artificially Expanded Genetic Information System » (176). Suivant les principes de liaison de Watson-Crick, il est composé de 12 blocs de deux bases auxquelles il est possible de greffer des groupements fonctionnels pouvant améliorer les caractéristiques de liaisons à une cible.

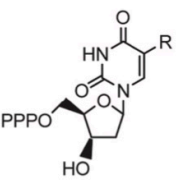
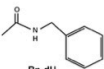
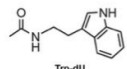
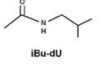
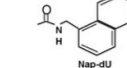
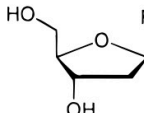

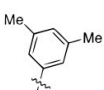
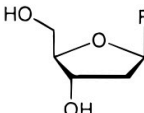
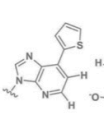
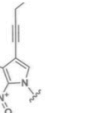
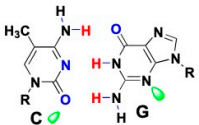
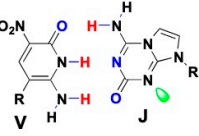
SOMAMER	UBP		
LARRY GOLD	FLOYD ROMESBERG	ICHIRO HIRAO	STEVEN BENNER
 <p>avec R =</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div>  <p>Bn-dU</p> </div> <div>  <p>Trp-dU</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div>  <p>iBu-dU</p> </div> <div>  <p>Nap-dU</p> </div> </div>	 <p>avec R =</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div>  <p>TM</p> </div> <div>  <p>DM</p> </div> </div>	 <p>avec R =</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div>  <p>Ds</p> </div> <div>  <p>Px</p> </div> </div>	<p><u>AEGIS</u></p> <p><u>Paire de base C-G :</u></p>  <p><u>Paire de base V-J :</u></p> 

Figure 36 - Différentes stratégies pour augmenter la diversité des acides nucléiques

Chaque modification de base est imagée par un exemple de groupement (SOMAmer) ou de nouvelle paire de base développée par les équipes de L. Gold, F. Romesberg, I. Hirao et S. Benner.

Une autre catégorie de modification, s'intéressant au sucre composant le nucléotide, est à l'origine d'une nouvelle classe de nucléotide modifiée : les Xeno-Nucléic Acid (XNA). Le désoxyribose originel est remplacé par un sucre artificiel parmi lesquels on trouve les LNA, ainsi que d'autres types de sucres modifiés (Figure 37) (129,177). La modification du sucre apporte une résistance aux nucléases sanguines permettant de générer des outils *in vivo* stable dans l'organisme. En 2018, l'équipe du Pr Holliger publie pour la première fois sur la sélection d'un aptamère XNA par SELEX dirigés contre une protéine et un élément ARN du VIH. La banque initiale contient des séquences XNA composées par des fluoroarabinonucleotides (FANA) (178). En 2012, Larry Gold émet des réserves concernant les XNA, en comparaison au SOMAmer de son équipe, mais souligne leur potentiel dans l'amélioration des propriétés pharmacocinétiques et de la biodisponibilité (179).

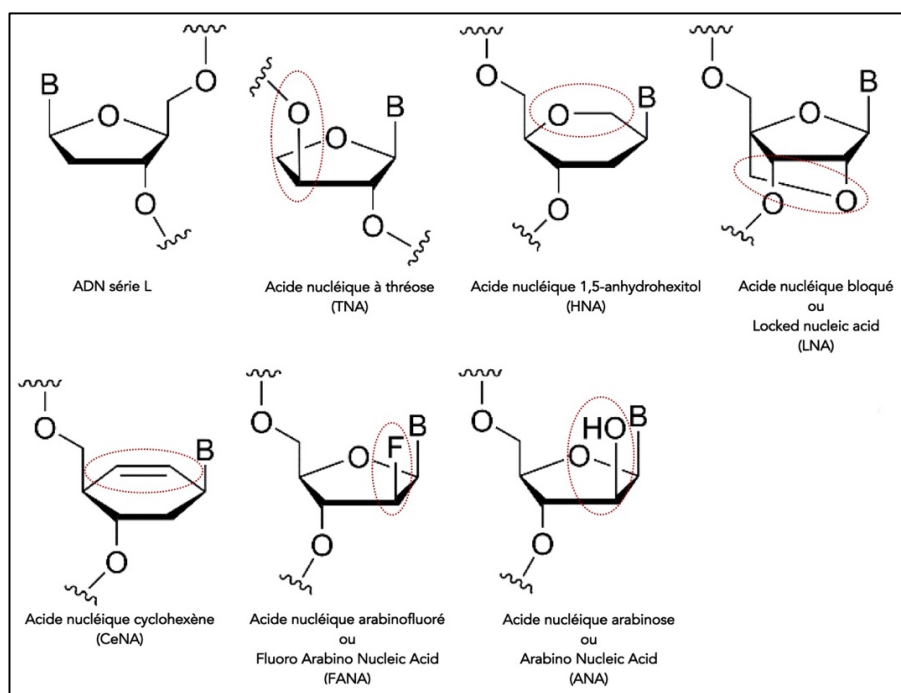


Figure 37 - Exemple de nucléotides XNA

L'ADN en série L est la structure naturelle d'un nucléotide. Les modifications apportées sont entourées par le cercle rouge sur les autres molécules.

Une dernière technologie développée pour la sélection d'aptamères est la technologie Spiegelmer® (Figure 38) (180). Alors que la conformation naturelle des acides nucléiques est de série D, les aptamères Spiegelmer® sont des acides nucléiques en série L, conformation miroir des premiers. Absent dans la nature, ils sont résistants aux nucléases sanguines. Plusieurs aptamères de cette technologie ont été sélectionnés contre différentes cibles avec succès, comme NOX-A12 et NOX-E36 qui sont en phase clinique (Tableau II) (181).

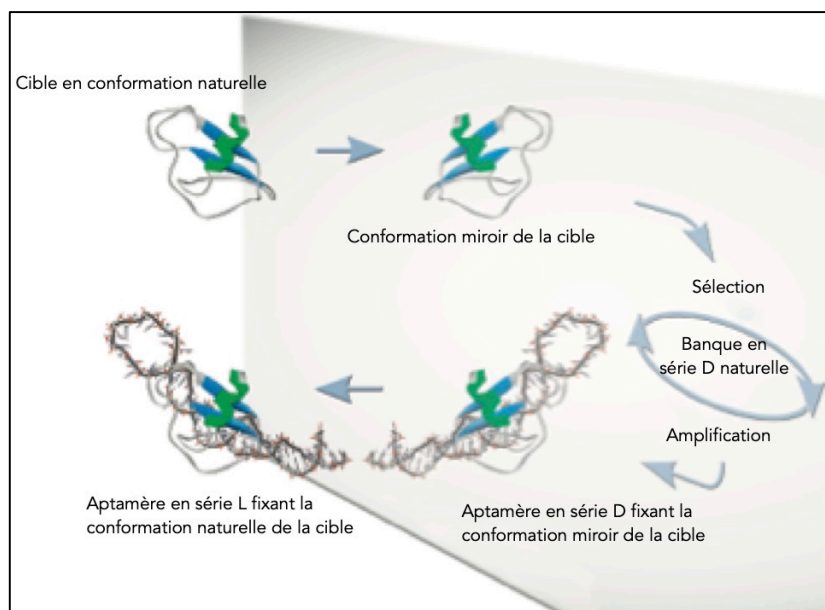


Figure 38 - Schéma explicatif de la technologie Spiegelmer®

Le SELEX est effectué avec des séquences en conformation naturelle des acides nucléiques (série-D) contre une conformation « miroir » de la cible. Les séquences sélectionnées sont ensuite synthétisées en série-L, conformation non-naturelle, permettant de fixer la cible dans sa conformation naturelle.

Optimisation de la méthode SELEX : nouvelles méthodes de sélection.

Mais augmenter la diversité de la banque initiale n'est pas suffisant pour écarter les problèmes liés à la méthode SELEX. Bien que son utilisation soit théoriquement facile, le processus de sélection peut être long à effectuer, coûteux et donner des résultats peu satisfaisants (65). Souffrant d'un manque de reproductibilité et de robustesse, il n'existe pas de protocole idéal pour chaque type de SELEX (85). En prenant en exemple le SELEX dirigés contre DDR2, on discerne deux obstacles : la pollution du SELEX par des séquences ne présentant pas d'intérêt et le manque de visibilité sur l'évolution des séquences en cours de sélection. Ces deux problèmes sont directement liés puisque l'absence de regard sur la composition des séquences empêche de prévenir la formation de sous-produits lors des PCR ou l'accumulation de séquences de faible intérêt. Les solutions disponibles permettent de répondre à plusieurs de ces problèmes en même temps. Parmi ces solutions on trouve le développement d'une méthode

SELEX en un nombre réduit de cycle (120). Ainsi, le SELEX idéal se déroulerait en un cycle, réduisant par la même occasion le temps total de sélection et la consommation en réactifs nécessaire (113). Mais en réduisant le SELEX à un cycle, on réduit également les chances d'obtenir de nouvelles structures intéressantes à l'aide de l'évolution darwinienne du SELEX. Deux alternatives sont envisageables pour réduire le nombre de cycle en conservant le caractère évolutif du SELEX. La première est de donner plus d'importance au NGS en permettant le séquençage après un nombre réduit de cycle. Le résultat du séquençage peut ainsi permettre d'identifier des séquences d'intérêt ayant déjà commencées à évoluer, et par la suite effectuer un SELEX dopé à partir de ces séquences modèles, comme envisagé pour le SELEX contre DDR2. La deuxième alternative est d'évaluer l'interaction entre les séquences candidates et la cible au cours ou après chaque cycle. Par exemple, l'utilisation de la méthode de qPCR a été utilisée et validée pour la quantification des séquences liées à la cible au cours d'un cell-SELEX dirigés contre des HEK-293 (Human embryonic kidney 293) (182). Adapté à des cibles protéiques ou peptidiques, cette technique permettrait de quantifier le pourcentage de séquences liées à la cible, à chaque cycle de SELEX, en utilisant une faible quantité des séquences sélectionnées lors du cycle, contrairement aux techniques par spectrofluorométrie nécessitant une plus grande quantité de séquence marquée pour obtenir un signal. Cette évaluation en parallèle de la sélection permet de suivre l'évolution des séquences au cours de la sélection et d'optimiser la durée et les conditions de stringence de chaque cycle. C'est avec ce même objectif que l'équipe du Pr Soh a développé la méthode de particle display (183) décrite dans la Figure 39. Elle permet de mesurer de façon quantitative l'affinité de chaque séquence candidate pour la cible en utilisant une technique d'analyse microfluidique à haut débit, le FACS (Fluorescence-Activated Cells Sorting). L'étape d'amplification par PCR par émulsion limite le phénomène de formation de sous-produits rencontré avec une PCR classique (122). La surveillance et le contrôle des conditions de sélection permet de choisir l'affinité minimale des séquences et assure la reproductibilité de la méthode.

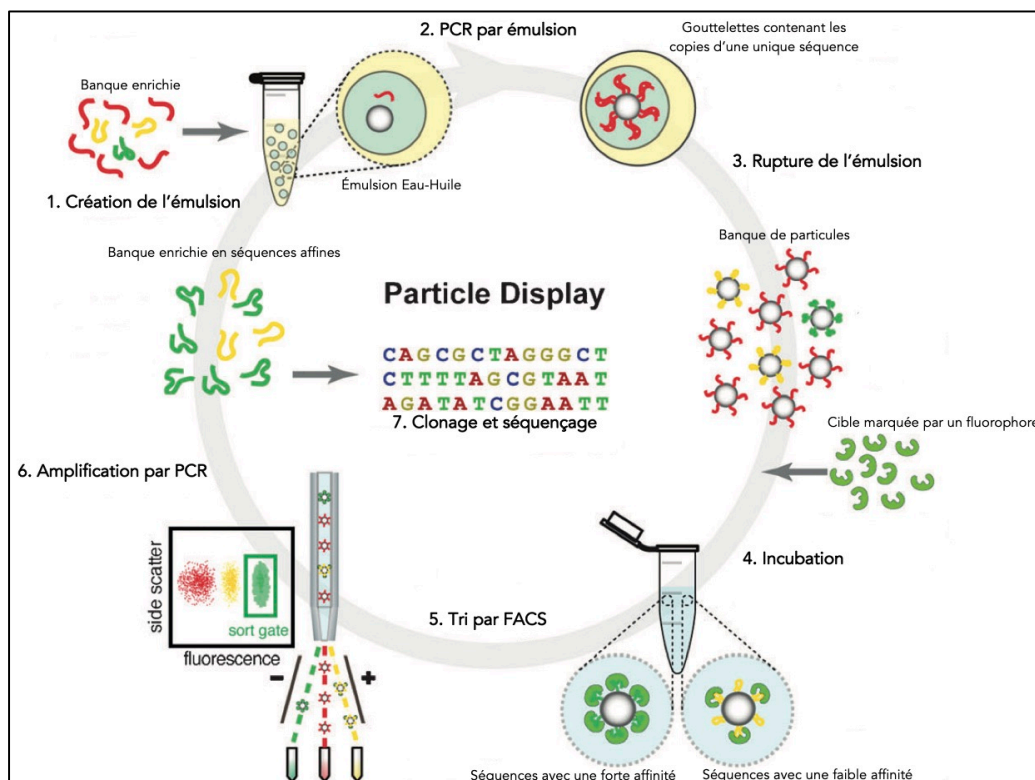


Figure 39 - Représentation d'un cycle de SELEX par Particle Display

La banque enrichie est intégrée dans des particules en émulsion : chaque particule contient une unique séquence (1). La séquence est amplifiée par PCR en émulsion (2). Après rupture de l'émulsion (3), les particules sont incubées avec la cible marquée par fluorescence (4). Les particules sont triées selon la fluorescence émise : les particules présentant les séquences les moins affines ont la plus faible fluorescence et sont éliminées (5). Les séquences sont ensuite amplifiées pour le cycle suivant (6). Elles sont ensuite séquencées et analysées (7).

Poursuivant ces objectifs d'optimisation de méthode et la recherche de diversité, une multitude de types de SELEX ont été développés (Annexe 2 – SELEX modernes) (184). Leur objectif reste identique : la sélection d'aptamères biosenseur dont l'intérêt est la capacité d'adopter une multitude de conformation dont une seule est capable d'induire un signal après liaison à une unique cible (185). Cette caractéristique des oligonucléotides, semblable au riboswitch naturel, est exploitée par une méthode SELEX appelée le Capture-SELEX. Le principe est de sélectionner des aptamères directement fonctionnels à l'aide d'une banque de séquences immobilisées à la surface de billes magnétiques. Contrairement aux autres types de SELEX au cours desquelles les séquences peuvent se fixer à la cible dans différentes conformations avec plus ou moins d'affinité, au cours de ce SELEX, seules les séquences présentant une conformation active unique se fixent à la cible en solution, leurs permettant de se détacher de la surface d'immobilisation, et d'être sélectionnées pour la suite du cycle (186). Avec ces nouvelles techniques, le nombre d'aptamères d'intérêt identifiés devrait augmenter de manière exponentielle au cours des prochaines années (113), avec diverses applications permises par leurs propriétés physico-chimiques.

Évolution des aptamères : nouvelles et futures applications.

Grâce à leur thermostabilité, les changements de températures n'affectent pas la capacité des aptamères à former une structure tridimensionnelle active (128). Cette caractéristique permet une application en diagnostic *in vitro*, dominé jusqu'alors par des essais utilisant des anticorps (64). Cette application a été envisagée dès les années 2000, notamment avec le développement du test ALISA pour la détection *in vitro* de l'agent bactérien la tularémie (82). Depuis, plusieurs tests ALISA ont été développés pour détecter d'autres agents bactériens. Les aptamères sont amenés à remplacer les anticorps dans les tests classiques pour constituer des tests ELONA/ELOSA (Enzyme Linked Oligonucleotide/Oligosorbent assay) suivant le même principe de détection par méthode sandwich (187,188). On peut ainsi développer des tests transportables sans conditions de température particulière.

Leur dynamique de conformations fait des aptamères des biosenseurs dynamiques intéressants pour le ciblage moléculaire. On a ainsi pu voir le développement d'outils comme les aptabeacons. Ce sont des aptamères dont la structure est composée d'une tige (par complémentarité de base) et d'une boucle, dont la conformation change en présence de la cible : cette dynamique est utilisée pour la détection *in vitro*. On trouve alors un fluorophore à une extrémité, et une molécule désactivatrice ou « quencher » à l'autre (189). Lorsque l'aptamère se fixe à la cible, les extrémités sont éloignées et une fluorescence est émise (Figure 40) (190)

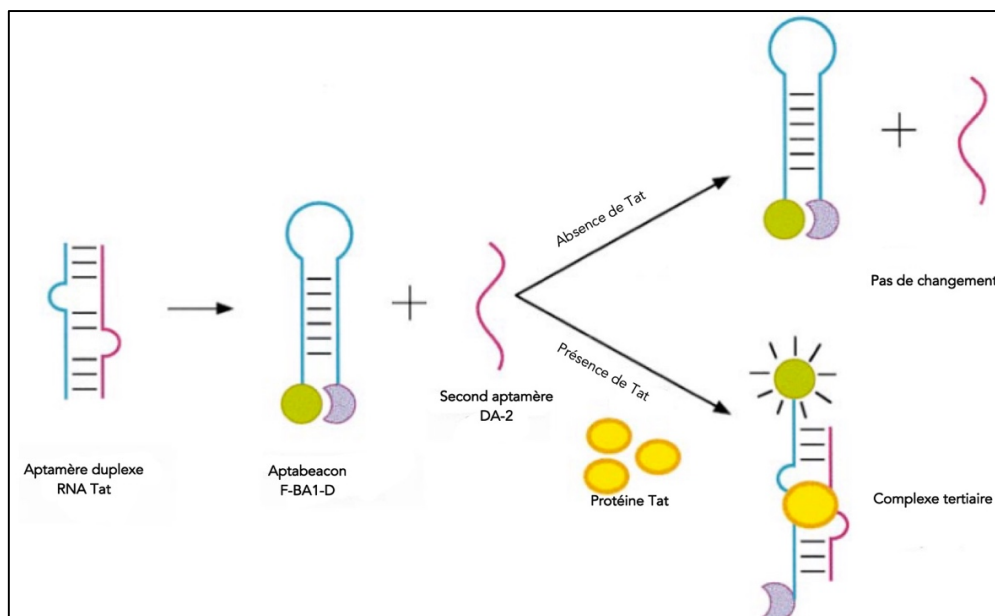


Figure 40 - Représentation d'un aptabeacon pour la détection de la protéine Tat du VIH

En conformation basale, les deux extrémités de l'aptamère F-BA1-D (bleu) sont proches l'une de l'autre grâce à la structure de tige : la fluorescence est inhibée par le quencher (violet). Au contact de la protéine Tat, l'aptamère change de structure pour adapter une conformation active : les extrémités sont écartées, un second aptamère DA-2 (magenta) de soutien vient reconnaître la cible et le fluorophore (vert) émet de la fluorescence.

La possibilité de modifier facilement la chimie des aptamères sans altérer leur statut de ligand est un argument supplémentaire en faveur du potentiel des aptamères. L'utilisation d'aptamères pour la détection *in vitro* a permis le développement de techniques associant aptamères modifiés et méthodes de mesures physiques. On trouve ainsi des aptamères couplés à des fluorophores utilisés dans des essais de type sandwich associé à une détection de fluorescence par méthode biophysique. Par exemple, on trouve l'aptamère RHA0385 sélectionné pour reconnaître les protéines hémagglutinines à la surface du virus de la grippe (191). Ce test, hautement spécifique, présente un seuil de détection, un temps de détection et un coût inférieur aux techniques actuelles employant des anticorps.

Plusieurs études ont aussi couplé des aptamères à des nanomatériaux (192). Des complexes aptamères-nanoparticules ont été développés pour la détection de cellules tumorales de cancer du sein (193). Il s'agit de deux aptamères reconnaissant deux biomarqueurs du cancer du sein, HER2 et MUC1, immobilisés à la surface d'une nanoparticule de silicium (Figure 41). Ces nanoparticules ne présentent pas de cytotoxicité, permettant une application pour un diagnostic *in vivo*.

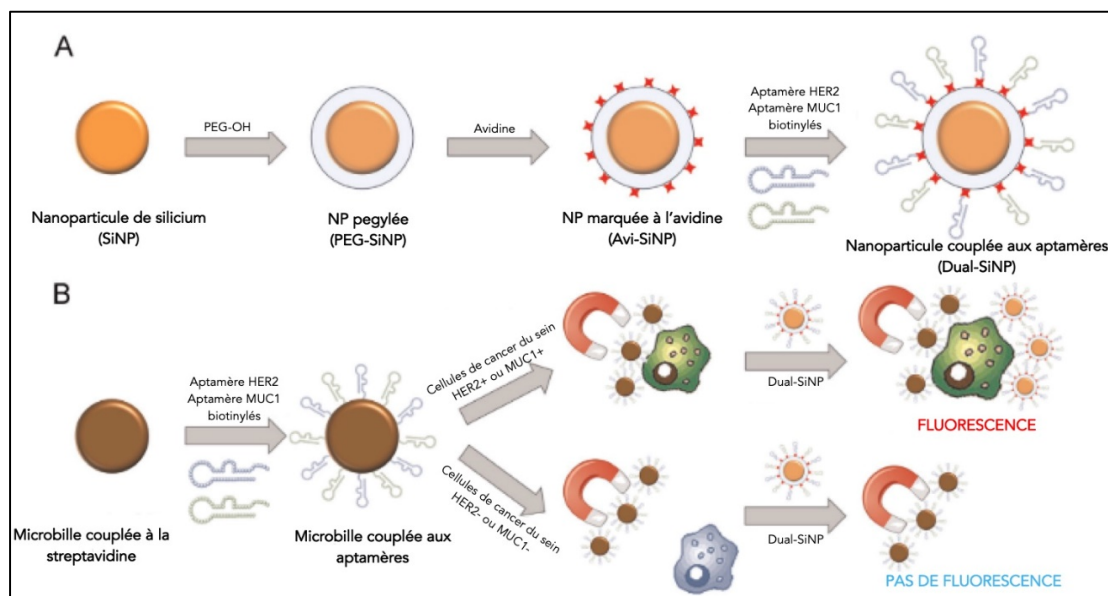


Figure 41 - Nanoparticules-aptamères pour la détection de cellules tumorales HER2+ et/ou MUC1+. Deux nanoparticules (NP) sont créées : une NP Silicium (orange) et une NP magnétique (marron). Les deux sont recouvertes des aptamères dirigés contre HER2 et MUC1. La NP magnétique immobilise la cellule tumorale, et la NP Silicium en se fixant à la cellule émet une fluorescence.

Au-delà de la détection *in vitro*, le marquage des aptamères est un outil essentiel pour leur utilisation en imagerie *in vivo*. Cette application a été présentée pour la première fois en 1997 avec un aptamère marqué au technécium-99 ciblant une protéine sécrétée par les neutrophile humain (141,194). Leur faible poids moléculaire leur permet une bonne pénétration tissulaire et le couplage à des produits d'imagerie a déjà été réalisé et utilisé avec succès dans des tests sur la souris (83). De plus, avec l'amélioration des techniques en imagerie médicale, les aptamères pourraient une nouvelle fois remplacer les anticorps qui ne sont plus en adéquation avec la précision des techniques modernes (195) : imagerie à résonnance magnétique (IRM), tomographie à émission de positron (TEP-scan), rayons X.

Ces deux caractéristiques (conformations dynamiques et modification chimiques) permettent de créer des systèmes « aptamer-mediated drug delivery », qui sont des aptamères délivrant un médicament dans l'environnement en présence d'une cible unique (77). La délivrance de traitement à l'aide d'un biosenseur-guide est une piste d'avenir pour l'oncologie : on peut ainsi concevoir le couplage d'une molécule habituellement utilisée en chimiothérapie à un aptamère ciblant un marqueur tumoral (163). Par exemple, l'aptamère A10 couplé à la doxorubicine permet de cibler les cellules tumorales du cancer de la prostate (196): le système est internalisé par la cellule, induisant sa mort cellulaire. La doxorubicine ne se retrouve qu'au niveau de la tumeur, réduisant sa présence dans d'autres organes et donc théoriquement la survenue des effets indésirables classiques des chimiothérapies (141). D'autres stratégies qui reposent sur des systèmes d'adressage sont en voie de développement comme la création de « nanobox » grâce à des origamis d'aptamères en chimie ADN, au sein desquels une molécule thérapeutique piégée est relâchée lors de la fixation à une cible ou après recapture cellulaire (191).

CONCLUSION

Le ciblage de biomarqueurs est un enjeu de la recherche biomédicale, particulièrement en oncologie. Pendant des années, les anticorps ont été les ligands de choix pour cet objectif. Dans les années 1990, de nouvelles classes de ligands ont fait leur apparition, avec pour principal objectif d'offrir une alternative aux anticorps. Parmi eux, on trouve les aptamères, séquences oligonucléotidiques en chimie ADN ou ARN capables de se fixer à une cible grâce à une structure tridimensionnelle complémentaire du site actif. Ils sont choisis par une méthode d'enrichissement par cycles itératifs de sélection, le SELEX, au cours desquelles une banque de séquences interagit avec la cible d'intérêt, permettant de séparer les séquences affines pour la cible et les séquences non liées. Grâce aux méthodes de séquençage NGS de plus en plus performante, les séquences sont analysées et les plus prometteuses sont évaluées par des méthodes physico-chimique afin de déterminer leurs caractéristiques pharmacologiques (constante de dissociation K_D , concentration efficace).

Le SELEX dirigé contre DDR2, un marqueur tumoral impliqué dans le mélanome métastatique, a permis de sélectionner quatre séquences candidates. Mais l'évolution de la diversité des séquences au cours de la sélection n'a pas montré les résultats escomptés. Un second SELEX, de type doped-SELEX, est envisagé, en utilisant les séquences sélectionnées pour le design d'une banque initiale randomisée. Celui-ci devrait permettre l'émergence de séquence ayant une plus grande affinité pour DDR2.

Parce qu'ils sont des biosenseurs historiques, les anticorps restent à ce jour le ligand de choix des biomarqueurs, et notamment des marqueurs tumoraux. Ainsi, près de 30 ans après le développement de la méthode SELEX, et malgré les promesses des aptamères en termes d'affinité, de spécificité et de maniabilité, le pegaptanib est le seul aptamère avec un statut d'agent thérapeutique. A travers le monde, différentes équipes de chercheurs, travaillant sur les acides nucléiques comme ligand, ont développés de nouvelles stratégies afin d'améliorer les caractéristiques et le processus de développement des aptamères : résistances aux nucléases sanguines, création de nouvelles paires de bases, création de nouveau type de sélection. Ces découvertes ont permis d'augmenter la diversité, de modifier les paramètres pharmacocinétiques pour une application *in vivo*, d'élargir le panel de cibles, de réduire le temps nécessaire et le coût d'une sélection.

Bien que le potentiel des aptamères semble orienté pour une application dans le domaine analytique, les avancées sur le plan de la recherche biomédicale sont motivées par un objectif unique : l'utilisation d'aptamères comme outils de détection et d'adressage. Ces derniers auraient la capacité d'une action diagnostique et thérapeutique simultanée, c'est-à-dire la détection d'une cible, la délivrance d'une molécule active et l'observation de la réponse thérapeutique à celle-ci, colocalisé dans l'organisme et en une seule fois (198). Ces ligands trouveraient rapidement leur place dans le concept de médecine personnalisée vers lequel s'oriente le monde médical (199). Même si l'absence d'aptamère de premier plan est un point négatif, elle peut s'expliquer par la domination quasi-totale des anticorps, pour lesquels l'industrie pharmaceutique a placé beaucoup d'espoir et d'investissements. Mais les avancées des dernières années comme le développement de tests de diagnostic *in vitro*, de senseur pour l'imagerie *in vivo* et de système de « drug delivery », couplées aux améliorations techniques pour une méthode SELEX rapide, moins coûteuse et reproductible sont autant d'arguments appuyant le statut des aptamères comme outils théranostiques d'avenir.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Aronson JK, Ferner RE.** Biomarkers—a general review. *Curr Protoc Pharmacol.* 2017;76:9.23.1-17
2. **Deyton L.** Importance of Surrogate Markers in Evaluation of Antiviral Therapy for HIV Infection. *J Am Med Assoc.* 1996;276(2):159–160.
3. **Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al.** Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89–95.
4. **Organization WH, on Chemical Safety IP.** Biomarkers in risk assessment : validity and validation. World Health Organization; 2001. p. Summary and conclusions in French (p. 235-236) and. (Environmental health criteria ; 222).
5. **Strimbu K, Tavel J.** What are Biomarkers ?. *Curr Opin HIV AIDS.* 2010;5(6):463–466.
6. **Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P.** Introduction to biosensors. *Essays Biochem.* 2016;60(1):1–8.
7. **Van Dorst B, Mehta J, Bekaert K, Rouah-Martin E, De Coen W, Dubruel P, et al.** Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: A review. *Biosens Bioelectron.* 2010;26(4):1178–1194.
8. **Norris DA.** Structure and Function of the Skin. *Goldman's Cecil Medicine: Twenty Fourth Edition.* Elsevier Inc. 2011;2:2498–2503.
9. **Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK.** The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol.* 2016;25(2):92–98.
10. **Damsky WE, Rosenbaum LE, Bosenberg M.** Decoding melanoma metastasis. *Cancers (Basel).* 2011;3(1):126–163.
11. **Ernfors P.** Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. *Exp Cell Res.* 2010;316(8):1397–1407.
12. **Longvert C, Saiag P.** Melanoma update. *Rev Med Interne.* 2019;40(3):178–183.
13. **Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M.** Melanoma : Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. *In vivo.* 2014;28(6):1005–1011.
14. **Arnold M, Kvaskoff M, Thuret A, Guénel P, Bray F, Soerjomataram I.** Cutaneous melanoma in France in 2015 attributable to solar ultraviolet radiation and the use of sunbeds. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2018;32(10):1681–1686.
15. **Dennis LK, Vanbeek MJ, Beane Freeman LE, Smith BJ, Dawson D V., Coughlin JA.** Sunburns and Risk of Cutaneous Melanoma: Does Age Matter? A Comprehensive Meta-Analysis. *Ann Epidemiol.* 2008;18(8):614–627.
16. **Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, et al.** Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer.* 2005;41(1):45–60.
17. **Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H, Corona R.** Cutaneous Melanomas Associated with Nevi. *Arch Dermatol.* 2003;139(12):1620–1624.

18. **Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, et al.** Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer*. 2005;41(14):2040–2059.
19. **Merghoub T, Polsky D, Houghton AN.** Molecular Biology of Melanoma. *Mol Basis Cancer*. 2008;463–470.
20. **Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, et al.** Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer*. 2005;41(1):28–44.
21. **INCA.** Les cancers en France - Edition 2017. 2018.
22. **Grange F.** Épidémiologie du mélanome cutané: Données descriptives en France et en Europe. *Ann Dermatol Venereol*. 2005;132(12):975–982.
23. **Azoury SC, Lange JR.** Epidemiology, Risk Factors, Prevention, and Early Detection of Melanoma. *Surg Clin North Am*. 2014;94(5):945–962.
24. **Raimondi S, Suppa M, Gandini S.** Melanoma Epidemiology and Sun Exposure. *Acta Derm Venereol*. 2020;100(11):250-258.
25. **Nguyen DX, Bos PD, Massagué J.** Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):274–284.
26. **Lebret T, Méjean A.** Physiopathologie de la métastase : du primitif au secondaire. *Prog en Urol*. 2008;18(SUPPL.7):147–155.
27. **Abbas O, Miller DD, & Bhawan J.** Cutaneous malignant melanoma. *Am J Dermatopathol*. 2014;36(5):363–379.
28. **Soyer HP, Argenziano G, Talamini R, Chimenti S.** Is dermoscopy useful for the diagnosis of melanoma? *Arch Dermatol*. 2001;137(10):1343–1350.
29. **Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M.** Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncol*. 2002;3(3):159–165.
30. **Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, et al.** Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2012. *Eur J Cancer*. 2012;48(15):2375–2390.
31. **Guillot B, Dalac S, Denis MG, Dupuy A, Emile JF, De La Fouchardiere A, et al.** French updated recommendations in Stage I to III melanoma treatment and management. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2017;31(4):594–602.
32. **Finn L, Markovic SN, Joseph RW.** Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Med*. 2012;10(1):23.
33. **Hodi FS, Lawrence D, Lezcano C, Wu X, Zhou J, Sasada T, et al.** Bevacizumab plus Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(7):632–642.
34. **Carlson JA, Ross JS, Slominski A, Linette G, Mysliborski J, Hill J, et al.** Molecular diagnostics in melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52(5):743–775.
35. **Holdenrieder S, Pagliaro L, Morgenstern D, Dayyani F.** Clinically meaningful use of blood tumor markers in oncology. *Biomed Res Int*. 2016;2016:1-10.

36. **Eisenstein A, Gonzalez EC, Raghunathan R, Xu X, Wu M, McLean EO, et al.** Emerging Biomarkers in Cutaneous Melanoma. *Mol Diagnosis Ther.* 2018;22(2):203–218.
37. **Kashani-Sabet M.** Molecular markers in melanoma. *Br J Dermatol.* 2014;170(1):31–35.
38. **Paul MK, Mukhopadhyay AK.** Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *Int J Med Sci.* 2004;1(2):101–115.
39. **Johnson JD, Edman JC, Rutter WJ.** Erratum: A receptor tyrosine kinase found in breast carcinoma cells has an extracellular discoidin I-like domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90(22):5677-5681.
40. **Vogel WF, Abdulhussein R, Ford CE.** Sensing extracellular matrix: An update on discoidin domain receptor function. *Cell Signal.* 2006;18(8):1108–1116.
41. **Valiathan RR, Marco M, et al.** Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;31(1–2):295–321.
42. **Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T.** The Discoidin Domain Receptors Tyrosine Kinases are activated by collagen. *Molecular cell.* 1997;1:13–23.
43. **Myllyharju J, Kivirikko KI.** Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 2004;20(1):33–43.
44. **Leitinger B.** Transmembrane Collagen Receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27(1):265–290.
45. **Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM.** Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(5):697–706.
46. **Leitinger B.** Molecular analysis of collagen binding by the human discoidin domain receptors, DDR1 and DDR2. *J Biol Chem.* 2003;278(19):16761–16769.
47. **Leitinger B, Kwan APL.** The discoidin domain receptor DDR2 is a receptor for type X collagen. *Matrix Biol.* 2006;25(6):355–364.
48. **Carafoli F, Bihan D, Stathopoulos S, Konitsiotis AD, Kvensakul M, Farndale RW, et al.** Crystallographic Insight into Collagen Recognition by Discoidin Domain Receptor 2. *Structure.* 2009;17(12):1573–1581.
49. **Carafoli F, Hohenester E.** Collagen recognition and transmembrane signalling by discoidin domain receptors. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2013;1834(10):2187–2194.
50. **Mihai C, Chotani M, Elton TS, Agarwal G.** Mapping of DDR1 Distribution and Oligomerization on the Cell Surface by FRET Microscopy. *J Mol Biol.* 2009;385(2):432–445.
51. **Wang CZ, Yeh YC, Tang MJ.** DDR1/E-cadherin complex regulates the activation of DDR1 and cell spreading. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2009;297(2):419-429.
52. **Poudel B, Lee YM, Kim DK.** DDR2 inhibition reduces migration and invasion of murine metastatic melanoma cells by suppressing MMP2/9 expression through ERK/NF- κ B pathway. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2015;47(4):292–298.

53. **Juin A, Di Martino J, Leitinger B, Henriët E, Gary AS, Paysan L, et al.** Discoidin domain receptor 1 controls linear invadosome formation via a Cdc42-Tuba pathway. *J Cell Biol.* 2014;207(4):517–533.
54. **Ezzoukhry Z, Henriët E, Cordelières FP, Dupuy JW, Maître M, Gay N, et al.** Combining laser capture microdissection and proteomics reveals an active translation machinery controlling invadosome formation. *Nat Commun.* 2018;9(1):2031.
55. **Henriët E, Sala M, Abou Hammoud A, Tuarihionoa A, Di Martino J, Ros M, et al.** Multitasking discoidin domain receptors are involved in several and specific hallmarks of cancer. *Cell Adhes Migr.* 2018;12(4):1-15.
56. **Rix U, Hantschel O, Dürnberger G, Remsing Rix LL, Planyavsky M, Fernbach N V, et al.** Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood.* 2007;110(12):4055–4063.
57. **Canning P, Tan L, Chu K, Lee SW, Gray NS, Bullock AN.** Structural mechanisms determining inhibition of the collagen receptor DDR1 by selective and multi-targeted type II kinase inhibitors. *J Mol Biol.* 2014;426(13):2457–2470.
58. **Li Y, Lu X, Ren X, Ding K.** Small molecule discoidin domain receptor kinase inhibitors and potential medical applications. *J Med Chem.* 2015;58(8):3287–3301.r
59. **Ferrigno PK.** Non-antibody protein-based biosensors. *Essays Biochem.* 2016;60(1):19–25.
60. **Ramírez-García G, Panikar SS, López-Luke T, Piazza V, Honorato-Colin MA, Camacho-Villegas T, et al.** An immunoconjugated up-conversion nanocomplex for selective imaging and photodynamic therapy against HER2-positive breast cancer. *Nanoscale.* 2018;10(21):10154–10165.
61. **Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, Brent R.** Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature.* 1996;380:548–550.
62. **Tuerk C, Gold L.** Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 1990;249(4968):505–510.
63. **A. D. Ellington, J. W. Szostak.** In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 1990;346:818–822.
64. **Yüce M, Ullah N, Budak H.** Trends in aptamer selection methods and applications. *Analyst.* 2015;140(16):5379–5399.
65. **Sun H, Zhu X, Lu PY, Rosato RR, Tan W, Zu Y.** Oligonucleotide aptamers: New tools for targeted cancer therapy. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2014;3:e182.
66. **Hermann T, Patel DJ.** Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science.* 2000;287(5454):820–825.
67. **Rentmeister A, Mayer G, Kuhn N, Famulok M.** Conformational changes in the expression domain of the Escherichia coli thiM riboswitch. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(11):3713–3722.
68. **Westhof E, Patel DJ.** Nucleic acids from self-assembly to induced-fit recognition. *Curr Opin Struct Biol.* 1997;7(3):305–309.
69. **Serganov A, Nudler E.** A decade of riboswitches. *Cell.* 2013;152(1–2):17–24.

70. **Winkler W, Nahvi A, Breaker RR.** Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*. 2002;419(6910):952–956.
71. **Boomer RM, Lewis SD, Healy JM, Kurz M, Wilson C, McCauley TG.** Conjugation to polyethylene glycol polymer promotes aptamer biodistribution to healthy and inflamed tissues. *Oligonucleotides*. 2005;15(3):183–195.
72. **Robertson DL, Joyce GF.** Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*. 1990;344:467–468.
73. **Shaw JP, Kent K, Bird J, Fishback J, Froehler B.** Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(4):747–750.
74. **Woo HM, Lee JM, Yim S, Jeong YJ.** Isolation of single-stranded DNA aptamers that distinguish influenza virus hemagglutinin subtype H1 from H5. *PLoS One*. 2015;10(4):1–13.
75. **Mina K, Hyun-Ju U, Sunbaek B, Sang-Hee L, Suk-Jung O, Ji-Hye H.** Arsenic Removal from Vietnamese Groundwater Using the Arsenic-Binding DNA Aptamer. *Environ Sci Technol*. 2009;43(24):9335–9340.
76. **Savory N, Lednor D, Tsukakoshi K, Abe K, Yoshida W, Ferri S, et al.** In silico maturation of binding-specificity of DNA aptamers against *Proteus mirabilis*. *Biotechnol Bioeng*. 2013;110(10):2573–2580.
77. **Xiang D, Shigdar S, Qiao G, Wang T, Kouzani AZ, Zhou SF, et al.** Nucleic acid aptamer-guided cancer therapeutics and diagnostics : the next generation of cancer medicine. *Theranostics*. 2015;5(1):23–42.
78. **Kong HY, Byun J.** Nucleic acid aptamers: New methods for selection, stabilization, and application in biomedical science. *Biomol Ther*. 2013;21(6):423–434.
79. **Ng EWM, Shima DT, Calias P, Cunningham ET, Guyer DR, Adamis AP.** Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(2):123–132.
80. **Fanelli R, Schembri L, Piarulli U, Pinoli M, Rasini E, Paolillo M, et al.** Effects of a novel cyclic RGD peptidomimetic on cell proliferation, migration and angiogenic activity in human endothelial cells. *Vasc Cell*. 2014;6(1):11-20.
81. **Jayasena SD.** Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem*. 1999;45(9):1628–1650.
82. **Vivekananda J, Kiel JL.** Anti-Francisella tularensis DNA aptamers detect tularemia antigen from different subspecies by Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay. *Lab Invest*. 2006;86(6):610–618.k
83. **Kryza D, Debordeaux F, Azéma L, Hassan A, Paurelle O, Schulz J, et al.** Ex vivo and in vivo imaging and biodistribution of aptamers targeting the human Matrix MetalloProtease-9 in melanomas. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149387.
84. **Da Rocha Gomes S, Miguel J, Azéma L, Eimer S, Ries C, Dausse E, et al.** 99mTc-MAG3-aptamer for imaging human tumors associated with high level of matrix metalloprotease-9. *Bioconjug Chem*. 2012;23(11):2192–2200.
85. **Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, Ruml T.** Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol Adv*. 2015;33(6):1141–1161.

86. **Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B.** SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng.* 2007;24(4):381–403.
87. **Bruno JG.** In vitro selection of DNA to chloroaromatics using magnetic microbead-based affinity separation and fluorescence detection. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;234(1):117–120.
88. **Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B.** FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal Bioanal Chem.* 2005;383(1):83–91.
89. **Challa S, Tzipori S, Sheoran A.** Selective evolution of ligands by exponential enrichment to identify rna aptamers against shiga toxins. *J Nucleic Acids.* 2014;2014:1–8.
90. **Hicke BJ, Marion C, Chang YF, Gould T, Lynott CK, Parma D, et al.** Tenascin-C Aptamers Are Generated Using Tumor Cells and Purified Protein. *J Biol Chem.* 2001;276(52):48644–48654.
91. **Ohuchi S.** Cell-Selex technology. *Biores Open Access.* 2012;1(6):265–272.
92. **Daniels DA, Chen H, Hicke BJ, Swiderek KM, Gold L.** A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(26):15416–15421.
93. **Sefah K, Shangguan D, Xiong X, O'Donoghue MB, Tan W.** Development of DNA aptamers using cell-selex. *Nat Protoc.* 2010;5(6):1169–1185.
94. **Jaszczyszyn Y, Thermes C, Van Dijk EL.** Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics.* 2014;30(9):418–426.
95. **Sanger F.** Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature.* 1977;265:687–695.
96. **Sanger F.** Determination of nucleotide sequences in DNA. *Biosci Rep.* 2004;24(4–5):237–253.
97. **Verma M, Rohde K, MacKenzie K, Hayward C, Torchin ME, Kuris AM, et al.** Genome Sequencing. *Methods in molecular biology.* 2017;1525:35–45.
98. **Metzker ML.** Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics.* 2010;11(1):31–46.
99. **Luo C, Tsementzi D, Kyrpides N, Read T, Konstantinidis KT.** Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS One.* 2012;7(2):e30087.
100. **Guo J, Yu L, Turro NJ, Ju J.** An integrated system for DNA sequencing by synthesis using novel nucleotide analogues. *Acc Chem Res.* 2010;43(4):551–563.
101. **Quang NN, Bouvier C, Henriques A, Lelandais B, Ducongé F.** Time-lapse imaging of molecular evolution by high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(15):7480–7494.
102. **Blank M.** Next-Generation Analysis of Deep Sequencing Data : Bringing Light into the Black Box of SELEX experiments. *Nucleic Acid Aptamers Sel Characterization Appl.* 2015;1380(1):151–160.
103. **Quang NN, Perret G, Ducongé F.** Applications of high-throughput sequencing for in vitro selection and characterization of aptamers. *Pharmaceuticals.* 2016;9(4):76–91.

104. **Alam KK, Chang JL, Burke DH.** FASTAptamer: A bioinformatic toolkit for high-throughput sequence analysis of combinatorial selections. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2015;4(3):e230.
105. **Zhang S, Bu X, Zhao H, Yu J, Wang Y, Li D, et al.** A host deficiency of discoidin domain receptor 2 (DDR2) inhibits both tumour angiogenesis and metastasis. *J Pathol*. 2014;232(4):436–448.
106. **McEntee K, Weinstock GM, Lehman IR.** recA protein-catalyzed strand assimilation: Stimulation by Escherichia coli single-stranded DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77(2):857–861.
107. **Javadi A, Shamaei M, Ziazi LM, Pourabdollah M, Dorudinia A, Seyedmehdi SM, et al.** Qualification study of two genomic DNA extraction methods in different clinical samples. *Tanaffos*. 2014;13(4):41–47.
108. **Tan SC, Yiap BC.** DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *J Biomed Biotechnol*. 2009;2009:574398.
109. **Liang C, Li D, Zhang G, Li H, Shao N, Liang Z, et al.** Comparison of the methods for generating single-stranded DNA in SELEX. *Analyst*. 2015;140(10):3439–3444.
110. **Chory J, Pollard JD.** Separation of Small DNA Fragments by Conventional Gel Electrophoresis. *Curr Protoc Mol Biol*. 1999;47(1):2.7.1-2.7.8.
111. **Konitsiotis AD, Raynal N, Bihan D, Hohenester E, Farndale RW, Leitinger B.** Characterization of high affinity binding motifs for the discoidin domain receptor DDR2 in collagen. *J Biol Chem*. 2008;283(11):6861–6868.
112. **Pan W, Clawson GA.** The shorter the better: Reducing fixed primer regions of oligonucleotide libraries for aptamer selection. *Molecules*. 2009;14(4):1353–1369.
113. **Wu YX, Kwon YJ.** Aptamers : The “evolution” of SELEX. *Methods*. 2016;106:21–28.
114. **Valenzano S, De Girolamo A, DeRosa MC, McKeague M, Schena R, Catucci L, et al.** Screening and Identification of DNA Aptamers to Tyramine Using in Vitro Selection and High-Throughput Sequencing. *ACS Comb Sci*. 2016;18(6):302–313.
115. **Tsuji S, Tanaka T, Hirabayashi N, Kato S, Akitomi J, Egashira H, et al.** RNA aptamer binding to polyhistidine-tag. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;386(1):227–231.
116. **Forloni M, Liu AY, Wajapeyee N.** Random mutagenesis using error-prone DNA polymerases. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(3):220–230.
117. **McInerney P, Adams P, Hadi MZ.** Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. *Mol Biol Int*. 2014;2014:1–8.
118. **Thiel WH, Bair T, Wyatt Thiel K, Dassie JP, Rockey WM, Howell CA, et al.** Nucleotide bias observed with a short SELEX RNA aptamer library. *Nucleic Acid Ther*. 2011;21(4):253–263.
119. **Schütze T, Wilhelm B, Greiner N, Braun H, Peter F, Mörl M, et al.** Probing the SELEX process with next-generation sequencing. *PLoS One*. 2011;6(12):e29604.
120. **Tolle F, Wilke J, Wengel J, Mayer G.** By-product formation in repetitive PCR amplification of DNA libraries during SELEX. *PLoS One*. 2014;9(12):e114693.

121. **Kalle E, Kubista M, Rensing C.** Multi-template polymerase chain reaction. *Biomol Detect Quantif.* 2014;2(C):11–29.
122. **Williams R, Peisajovich SG, Miller OJ, Magdassi S, Tawfik DS, Griffiths AD.** Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR. *Nat Methods.* 2006;3(7):545–550.
123. **Polz MF, Cavanaugh CM.** Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(10):3724–3730.
124. **Zuker M.** Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3406–3415.
125. **Beaudry AA, Joyce GF.** Directed evolution of an RNA enzyme. *Science.* 1992;257(5070):635–641.
126. **Knight R.** Analyzing partially randomized nucleic acid pools: straight dope on doping. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(6):e30.
127. **Bartel DP, Zapp ML, Green MR, Szostak JW.** HIV-1 rev regulation involves recognition of non-Watson-Crick base pairs in viral RNA. *Cell.* 1991;67(3):529–536.
128. **Gotrik MR, Feagin TA, Csordas AT, Nakamoto MA, Soh HT.** Advancements in Aptamer Discovery Technologies. *Acc Chem Res.* 2016;49(9):1903–1910.
129. **Sharma TK, Bruno JG, Dhiman A.** ABCs of DNA aptamer and related assay development. *Biotechnol Adv.* 2017;35(2):275–301.
130. **Sassolas A, Blum LJ, Leca-Bouvier BD.** Homogeneous assays using aptamers. *Analyst.* 2011;136(2):257–274.
131. **González-Fernández E, De-Los-Santos-Álvarez N, Miranda-Ordieres AJ, Lobo-Castañón MJ.** SPR evaluation of binding kinetics and affinity study of modified RNA aptamers towards small molecules. *Talanta.* 2012;99:767–773.
132. **Sakamoto T, Ennifar E, Nakamura Y.** Thermodynamic study of aptamers binding to their target proteins. *Biochimie.* 2017;145:91–97.
133. **McKeague M, De Girolamo A, Valenzano S, Pascale M, Ruscito A, Velu R, et al.** Comprehensive Analytical Comparison of Strategies Used for Small Molecule Aptamer Evaluation. *Anal Chem.* 2015;87(17):8608–8612.
134. **Ni S, Yao H, Wang L, Lu J, Jiang F, Lu A, et al.** Chemical modifications of nucleic acid aptamers for therapeutic purposes. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8):1683–1704.
135. **Gao S, Zheng X, Jiao B, Wang L.** Post-SELEX optimization of aptamers. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(17):4567–4573.
136. **Nadal P, Svobodova M, Mairal T, O'Sullivan CK.** Probing high-affinity 11-mer DNA aptamer against Lup an 1 (β -conglutin). *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(29):9343–9349.
137. **Zheng X, Hu B, Gao SX, Liu DJ, Sun MJ, Jiao BH, et al.** A saxitoxin-binding aptamer with higher affinity and inhibitory activity optimized by rational site-directed mutagenesis and truncation. *Toxicon.* 2015;101:41–47.
138. **Wang RE, Wu H, Niu Y, Cai J.** Improving the Stability of Aptamers by Chemical Modification. *Curr Med Chem.* 2011;18(27):4126–4138.
139. **Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, et al.** LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature.* 2008;452(7189):896–899.

140. **Eaton BE, Gold L, Hicke BJ, Janjić N, Jucker FM, Sebesta DP, et al.** Post-SELEX combinatorial optimization of aptamers. *Bioorganic Med Chem.* 1997;5(6):1087–1096.
141. **Reinemann C, Strehlitz B.** Aptamer-modified nanoparticles and their use in cancer diagnostics and treatment. *Swiss Med Wkly.* 2014;144(January):w13908.
142. **Shangguan D, Tang Z, Mallikaratchy P, Xiao Z, Tan W.** Optimization and modifications of aptamers selected from live cancer cell lines. *ChemBioChem.* 2007;8(6):603–606.
143. **Srivastava S, Kramer BS.** Early detection cancer research network. *Lab Investig.* 2000;80(8):1147–1148.
144. **Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T.** Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell.* 1986;47(1):131–139.
145. **Yoshida T, Akatsuka T, Imanaka-Yoshida K.** Tenascin-C and integrins in cancer. *Cell Adhes Migr.* 2015;9(1–2):96–104.
146. **Ming X, Qiu S, Liu X, Li S, Wang Y, Zhu M, et al.** Prognostic role of tenascin-C for cancer outcome: A meta-analysis. *Technol Cancer Res Treat.* 2019;18:1–9.
147. **Paganelli G, Grana C, Chinol M, Cremonesi M, De Cicco C, De Braud F, et al.** Antibody-guided three-step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin. *Eur J Nucl Med.* 1999;26(4):348–357.
148. **Cokgor I, Akabani G, Kuan CT, Friedman HS, Friedman AH, Coleman RE, et al.** Phase I trial results of iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 treatment of patients with newly diagnosed malignant gliomas. *J Clin Oncol.* 2000;18(22):3862–3872.
149. **Jacobson O, Yan X, Niu G, Weiss ID, Ma Y, Szajek LP, et al.** PET imaging of tenascin-C with a radiolabeled single-stranded DNA aptamer. *J Nucl Med.* 2015;56(4):616–621.
150. **Nimjee SM, White RR, Becker RC, Sullenger BA.** Aptamers as Therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2017;57(1):61–79.
151. **Nimjee SM, Rusconi CP, Sullenger BA.** Aptamers: An Emerging Class of Therapeutics. *Annu Rev Med.* 2005;56(1):555–583.
152. **Cruz-Aguado JA, Penner G.** Determination of ochratoxin A with a DNA aptamer. *J Agric Food Chem.* 2008;56(22):10456–10461.
153. **Sun H, Zu Y.** A Highlight of recent advances in aptamer technology and its application. *Molecules.* 2015;20(7):11959–11980.
154. **Gold L, Polisky B, Yarus M.** Diversity of oligonucleotide functions. *Nature.* 1995;64:763–797.
155. **Sankar MJ, Sankar J, Chandra P.** Anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs for treatment of retinopathy of prematurity. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;2018(1).
156. **Maier KE, Levy M.** From selection hits to clinical leads: progress in aptamer discovery. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 2016;3:16014–16024.

157. **Liu Y, Mao J, Zhou B, Wei W, Gong S.** Peptide aptamers against titanium-based implants identified through phage display. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;21(4):1103–1107.
158. **Mascini M, Palchetti I, Tombelli S.** Nucleic acid and peptide aptamers: Fundamentals and bioanalytical aspects. *Angew Chemie - Int Ed.* 2012;51(6):1316–1332.
159. **Scorr JK, Smith GP.** Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library. *Science.* 1990;249:386-390.
160. **Reverdatto S, Burz D, Shekhtman A.** Peptide Aptamers: Development and Applications. *Curr Top Med Chem.* 2015;15(12):1082–1101.
161. **Baines IC, Colas P.** Peptide aptamers as guides for small-molecule drug discovery. *Drug Discov Today.* 2006;11(7–8):334–341.
162. **Bunka DHJ, Stockley PG.** Aptamers come of age - At last. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(8):588–596.
163. **Song KM, Lee S, Ban C.** Aptamers and their biological applications. *Sensors.* 2012;12(1):612–631.
164. **Torelli E, Kozyra JW, Gu JY, Stimming U, Piantanida L, Voïtchovsky K, et al.** Isothermal folding of a light-up bio-orthogonal RNA origami nanoribbon. *Sci Rep.* 2018;8(1):6989-7001.
165. **Lohmann F, Ackermann D, Famulok M.** Reversible light switch for macrocycle mobility in a DNA rotaxane. *J Am Chem Soc.* 2012;134(29):11884–11887.
166. **Azéma L, Bonnet-salomon S, Endo M, Takeuchi Y, Durand G, Emura T, et al.** Triggering nucleic acid nanostructure assembly by conditionnal kissing interactions. *Nucleic Acids Research.* 2018;46(3):1052–1058.
167. **Yan AC, Levy M.** Aptamer-Mediated Delivery and Cell-Targeting Aptamers: Room for Improvement. *Nucleic Acid Ther.* 2018;28(3):194–199.
168. **Zhou B, Wang B.** Pegaptanib for the treatment of age-related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 2006;83(3):615–619.
169. **Chapman JA, Beckey C.** Pegaptanib: A novel approach to ocular neovascularization. *Ann Pharmacother.* 2006;40(7–8):1322–1326.
170. **Rohloff JC, Gelinas AD, Jarvis TC, Ochsner UA, Schneider DJ, Gold L, et al.** Nucleic acid ligands with protein-like side chains: Modified aptamers and their use as diagnostic and therapeutic agents. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2014;3(October):e201.
171. **Kraemer S, Vaught JD, Bock C, Gold L, Katilius E, Keeney TR, et al.** From SOMAmer-based biomarker discovery to diagnostic and clinical applications: A SOMAmer-based, streamlined multiplex proteomic assay. *PLoS One.* 2011;6(10):e26332.
172. **Lee KH, Hamashima K, Kimoto M, Hirao I.** Genetic alphabet expansion biotechnology by creating unnatural base pairs. *Curr Opin Biotechnol.* 2018;51:8–15.
173. **Ogawa AK, Wu Y, McMin DL, Liu J, Schultz PG, Romesberg FE.** Efforts toward the expansion of the genetic alphabet: Information storage and replication with unnatural hydrophobic base pairs. *J Am Chem Soc.* 2000;122(14):3274–3287.

174. **Kimoto M, Yamashige R, Matsunaga KI, Yokoyama S, Hirao I.** Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. *Nat Biotechnol.* 2013;31(5):453–7.
175. **Kimoto M, Nakamura M, Hirao I.** Post-ExSELEX stabilization of an unnatural-base DNA aptamer targeting VEGF165 toward pharmaceutical applications. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(15):7487–7494.
176. **Biondi E, Benner SA.** Artificially expanded genetic information systems for new aptamer technologies. *Biomedicines.* 2018;6(2):53–66.
177. **Meek KN, Rangel AE, Heemstra JM.** Enhancing aptamer function and stability via in vitro selection using modified nucleic acids. *Methods.* 2016;106(March):29–36.
178. **Taylor AI, Holliger P.** Selecting Fully-Modified XNA Aptamers Using Synthetic Genetics. *Curr Protoc Chem Biol.* 2018;10(2):e44.
179. **Steele FR, Gold L.** The sweet allure of XNA. *Nat Biotechnol.* 2012;30(7):624–625.
180. **Vater A, Klussmann S.** Turning mirror-image oligonucleotides into drugs: The evolution of Spiegelmer® therapeutics. *Drug Discov Today.* 2015;20(1):147–155.
181. **Hoellenriegel J, Zboralski D, Maasch C, Rosin NY, Wierda WG, Keating MJ, et al.** The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization. *Blood.* 2014;123(7):1032–1039.
182. **Avci-Adali M, Wilhelm N, Perle N, Stoll H, Schlensak C, Wendel HP.** Absolute Quantification of Cell-Bound DNA Aptamers During SELEX. *Nucleic Acid Ther.* 2013;23(2):125–130.
183. **Wang J, Gong Q, Maheshwari N, Eisenstein M, Arcila ML, Kosik KS, et al.** Particle display: A quantitative screening method for generating high-affinity aptamers. *Angew Chemie - Int Ed.* 2014;53(19):4886–4901.
184. **Ali MH, Elsherbiny ME, Emara M.** Updates on aptamer research. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10):2511–2534.
185. **O'Sullivan CK.** Aptasensors - The future of biosensing? *Fresenius J Anal Chem.* 2002;372(1):44–48.
186. **Stoltenburg R, Nikolaus N, Strehlitz B.** Capture-SELEX: Selection of DNA aptamers for aminoglycoside antibiotics. *J Anal Methods Chem.* 2012;1(1):1–14.
187. **Kubiczek D, Bodenberger N, Rosenau F.** Aptamers as promising agents in diagnostic and therapeutic applications. *Antimicrob Res Nov bioknowledge Educ programs.* 2017;6:368–378.
188. **Toh SY, Citartan M, Gopinath SCB, Tang TH.** Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosens Bioelectron.* 2015;64:392–403.
189. **Song S, Wang L, Li J, Fan C, Zhao J.** Aptamer-based biosensors. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2008;27(2):108–117.
190. **Yamamoto R, Kumar PKR.** Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of Tat protein of HIV-1. *Genes to Cells.* 2000;5(5):389–396.

191. **Kukushkin VI, Ivanov NM, Novoseltseva AA, Gambaryan AS, Yaminsky I V., Kopylov AM, et al.** Highly sensitive detection of influenza virus with SERS aptasensor. *PLoS One*. 2019;14(4):e0216247.
192. **Jo H, Ban C.** Aptamer-nanoparticle complexes as powerful diagnostic and therapeutic tools. *Exp Mol Med*. 2016;48(5):e230-e239.
193. **Jo H, Her J, Ban C.** Dual aptamer-functionalized silica nanoparticles for the highly sensitive detection of breast cancer. *Biosens Bioelectron*. 2015;71:129–136.
194. **Charlton J, Sennello J, Smith D.** In vivo imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase. *Chem Biol*. 1997;4(11):809–816.
195. **Gomes de Castro MA, Rammner B, Opazo F.** Aptamer Stainings for Super-resolution Microscopy. *Methods Mol Biol*. 2016;1380:113–125.
196. **Min K, Jo H, Song K, Cho M, Chun YS, Jon S, et al.** Dual-aptamer-based delivery vehicle of doxorubicin to both PSMA (+) and PSMA (-) prostate cancers. *Biomaterials*. 2011;32(8):2124–2132.
197. **Li H, LaBean TH, Leong KW.** Nucleic acid-based nanoengineering: Novel structures for biomedical applications. *Interface Focus*. 2011;1(5):702–724.
198. **Wang D, Lee MMS, Xu W, Kwok RTK, Lam JWY, Tang BZ.** Theranostics based on AIEgens. *Theranostics*. 2018;8(18):4925–4956.
199. **Ryu JH, Lee S, Son S, Kim SH, Leary JF, Choi K, et al.** Theranostic nanoparticles for future personalized medicine. *J Control Release*. 2014;190:477–484.

ANNEXES*ANNEXE 1 : Solutions de réaction, de tampons et de gels.*

LISTE DES TAMPONS			
Phosphate Buffer Saline = PBS 1X			
Composition		Concentration finale	Température de stockage
NaCl		137mM	4°C
KCl		2,7mM	
Na ₂ HPO ₄		10mM	
KH ₂ PO ₄		1,76mM	
Tampon pour les cycles de Beads-SELEX			
PBS – Tween 20 (PBS-T)			
Composition		Concentration finale	Température de stockage
PBS		1X	4°C
Tween 20		0,005%	
Tampon pour les cycles de Filtration-SELEX			
Tampon de liaison aux protéines = PBS – Mg – BSA (5mL)			
	Volume	Concentration initiale	Concentration finale
BSA	27,5µL	3 mg/mL	16,5 µg/mL
Mg ²⁺	25µL	1M	5mM
PBS	2,5mL	10X	5X
H ₂ O	Qsp 5mL		
Tampon de lavage = PBS – Mg 5X (10mL)			
	Volume	Concentration initiale	Concentration finale
PBS ambion	5mL	10X	5X
Mg ²⁺	50µL	1M	5mM
H ₂ O	Qsp 10mL		
Tampon pour les cycles de Cell-SELEX			
Tampon de liaison (10mL)		Tampon de lavage (50mL)	
	Quantité		Quantité
Glucose	45mg	Glucose	225mg
MgCl ₂ (1M)	50µL	MgCl ₂ (1M)	200µL
BSA	10mg	DPBS	Qsp 50mL
tRNA	100µg	Conserver maximum 1 mois à 4°C.	
DPBS	Qsp 10mL		
Tampon d'extraction des oligonucléotides du gel			
TENaCl (100mL)			
	Volume	Concentration initiale	Concentration finale
Tris HCl (pH7.5)	1mL	1M	10mM
NaCl	500µL	5M	25mM
EDTA	200µL	0,5M	1mM
H ₂ O	Qsp 100mL		

CIBLAGE D'UN BIOMARQUEUR PAR UN APTAMÈRE

Tampon Carbonate 0,2M pH8,3			
	Quantité	pH ajusté à 8,3 avec une solution NaOH 1M	
NaCO ₃ H	2,1g		
NaCl	5,84g		
EDTA	37,2mg		
H ₂ O	Qsp 100mL		
FLB : Formamide Loading Buffer (10mL)			
	Volume/Quantité	Concentration initiale	Concentration finale
Formamide	9mL	99,8 M	10mM
EDTA (pH8,3)	200µL	0,5M	25mM
Cyanure de xylène	0,25mg	-	25mg/L
Bleu de bromophénol	0,25mg	-	25mg/L
H ₂ O	Qsp 10mL		
LB 5X : Loading Buffer pour électrophorèse (1 mL)			
	Volume	Concentration initiale	Concentration finale
glycerol	800µL	100%	80%
TBE	50µL	10X	0,5X
Bromophenol	1 goutte		
H ₂ O	Qsp 1mL		
TBE 0,5X (500mL)			
	Volume	Concentration initiale	Concentration finale
TBE	25mL	10X	0,5X
H ₂ O	Qsp 500mL		
Solution Stains All 0,5% (200mL)			
	Volume	Concentration initiale	Concentration finale
Formamide	90mL	10%	0,45%
Stains All Stock	30mL	0,1%	0,05%
H ₂ O	Qsp 200mL		

Préparation de PAGE pour vérification de la taille d'oligonucléotides commerciaux.

PAGE (30mL)	6%	8%	20%
Acrylamide 20%	9mL	12mL	30mL
Acrylamide 0%	21mL	18mL	0mL
APS 10%	300µL	300µL	300µL
TEMED	30µL	30µL	30µL

Préparation de PAGE pour purification d'un pool de sélection après amplification.

PAGE (70mL)	8%
Acrylamide 20%	28mL
Acrylamide 0%	42mL
APS 10%	700µL
TEMED	70µL

Préparation gel d'agarose 3% pour électrophorèse de contrôle.

	Volume/Quantité	Chauffer au micro-onde jusqu'à fusion de l'agarose. Attendre 5 minutes et ajouter l'éthidium bromide. Couler le gel et conservé dans du TBE 0,5X
Agarose	3mg	
TBE (0,5X)	100mL	
Ethidium Bromide	2 gouttes	

ANNEXE 2 : SELEX modernes, issue de « Updates on aptamer research » de M. Ali et al. (2019)

SELEX Type	Principle	Aim	Application/Result	Year
Negative SELEX	In vitro selection of single-stranded oligonucleotides against a target after removing sequences that bind to partitioning/immobilization matrices	<ul style="list-style-type: none"> Remove false-positive sequences selected against the partitioning matrices Increase SELEX affinity by preventing non-specific interaction 	Isolated ligand-specific aptamers that selectively bind to small molecules (dyes)	1992
In vivo SELEX	The selection and amplification steps occur inside the living cell using retroviral-based replication system	Produce aptamers that are functional in vivo	Provided a method to transfer aptamer selection and amplification from in vitro to in vivo	1993
Counter SELEX	Uses a second elution step against a molecule of similar target structure (e.g., caffeine, which differs from theophylline at the N-7 position)	Increase aptamer's specificity and affinity towards target molecules	Isolated aptamer of high-specificity to theophylline	1994
cDNA-SELEX	Uses a preselected natural oligonucleotide pool that binds to the protein of interest rather than using a synthetic library	Identify natural library that interact with the protein of interest	Provided a new approach to study the interaction between the nucleotides and the protein of interest	1995
Blended SELEX	Forming a blended-pool through linking molecules (e.g., inhibitor) to a specific site on the library that will be subjected to SELEX	<ul style="list-style-type: none"> Obtain a highly active and specific variable of the bound sequence through incorporation of functional non-nucleic moieties Obtain aptamers toward a specific site of the target 	<ul style="list-style-type: none"> Provided a new strategy to design the aptamer toward different moieties that can be attached to the library Provided alternative way to enrich the target pools required for drug discovery 	1995
<ul style="list-style-type: none"> PhotoSELEX Photo-crosslinking 	Uses photoactivatable aptamers to crosslink and/or photoactive the target	<ul style="list-style-type: none"> Select aptamers of high-sensitivity, affinity, and specificity Photo-induced crosslinking allows rigorous washing 	<ul style="list-style-type: none"> In Vitro selection of aptamers that can photo-crosslink HIV-1 Rev protein and human basic fibroblast growth factor 	1995 2000
Spiegelmer®	Selection of D-oligonucleotides against a mirrored target. Then, the D-oligonucleotides will be synthesized as L-oligonucleotides that can bind to unmirrored target	Increase aptamer stability against nucleases	Identified an endonuclease-stable L-RNA aptamer that binds to D-adenosine	1996

CIBLAGE D'UN BIOMARQUEUR PAR UN APTAMÈRE

SELEX Type	Principle	Aim	Application/Result	Year
Magnetic bead-based SELEX	Uses magnetic beads for immobilization	<ul style="list-style-type: none"> ■ Use small amount of target ■ Achieve easy and quick separation of protein-aptamer complex from the free oligonucleotides 	Provided a new method to avoid DNA precipitation	1997
EMSA-SELEX	Uses EMSA partitioning at every cycle of the selection process	Identify a method to study oligonucleotides binding to proteins	Identified the role of specific zinc finger motifs in the Roaz protein that help in DNA-protein binding and protein-protein interaction	1998
Cell-SELEX	Identifies aptamers that bind specifically to different cells or targets on cell membrane	<ul style="list-style-type: none"> ■ Design high-affinity aptamer towards any single protein ■ Identify aptamers specific for cell membrane targets 	Identified aptamers that binds to specific cell (e.g., RBCs) or cell surface protein (e.g., variant surface glycoprotein of Trypanosoma brucei)	1998 1999
Chimeric SELEX	Fuses pre-selected aptamers of different targets together to form a combined small library followed by applying a dual selection pressure to select aptamers that can bind to multiple targets	Generate dual-function aptamers	Generated an engineered dual-function aptamer capable of testing/binding to two distinct features/targets	1998
Multi-stage SELEX	Modified chimeric-based SELEX followed by an extra selection with entirety of targets	Develop an allosteric synthetic aptamer	Provided a method to study the allosteric interactions in the DNA	1999
Indirect selection	Aptamer binds to a "primary target." Binding to this target is required for aptamer binding to the main target	Develop a transition-state-bound aptamer that facilitates its binding to the main target	Generated Zn ²⁺ -dependent aptamer molecule for specific target binding to HIV-1 Tat protein	2000
Toggle-SELEX	A "polyclonal" aptamer selection strategy that generates aptamer capable of binding to multiple proteins through incubating the pre-selected aptamer with a second target until the aptamer can identify another region for binding	Select aptamers against homologous targets depending on cross-reactivity	<ul style="list-style-type: none"> ■ Selected in vitro "polyclonal" aptamer that can bind to human and porcine thrombin ■ Provided a cheap method to produce aptamers for animal testing 	2001
<ul style="list-style-type: none"> ■ Truncation SELEX ■ Primer-free genomic SELEX ■ MP-SELEX (Primer-bridge PCR) ■ PF-SELEX (self-bridge RT-PCR) 	Truncates fixed regions present in the aptamers sequences that may limit the structure variations or reduce the ability of aptamer binding to the target	<ul style="list-style-type: none"> ■ Generate aptamer with minimized or eliminated fixed sequences ■ Avoid nonspecific binding ■ Avoid chemical modification 	Provided a method to control aptamer-fixed sequences	2001 2004 2008 2010
Expression Cassette SELEX	Fuses a pre-selected aptamer with a polymerase III promoter "expression cassette" in a DNA plasmid	Produce highly expressed levels of functional aptamers	<ul style="list-style-type: none"> ■ Provided a method to increase aptamer expression ■ Produced stable aptamers 	2002

SELEX Type	Principle	Aim	Application/Result	Year
NECEEM	Uses non-equilibrium conditions to separate the constituents of protein-DNA mixture (free and bound components)	<ul style="list-style-type: none"> Produce high separation efficacy Study macromolecular interaction 	Provided a novel electrophoretic method for studying protein-DNA interaction and K_d of the DNA-protein complex	2002
Subtractive SELEX	Similar to counter SELEX where it adopts extra SELEX rounds to control target binding	Distinguish cell subtypes of homologous origin	Distinguished between differentiated and normal PC12 cells	2003
Tailored SELEX	Isolation of short aptamer through designing of cleavable sites to remove fixed sequences	<ul style="list-style-type: none"> Produce short aptamer sequence without the need for primers Avoid post-SELEX truncation 	Provided a new method to identify short fixed nucleotides aptamers through ligation and removal of primer	2003
CE-SELEX	Uses differential electrophoretic separation at every SELEX round after aptamer binds to the target	<ul style="list-style-type: none"> Reduce the selection rounds Decrease the selection time 	Standardized the SELEX method and made it more efficient	2004
SweepCE	Uses protein non-stopped flow in the capillary electrophoresis to form DNA-protein complex that causes sweeping of the DNA	<ul style="list-style-type: none"> Produce faster aptamer-target complex formation Measure the rate-constant of complex formation 	Provided a method that help in studying the equilibrium and kinetic parameters during protein-DNA complex formation	2004
On-chip selection	On-chip selection method combined with point-mutation of the sequence and usage of genetic algorithm to produce aptamers	Generate different aptamers against different target molecules	Generated aptamers against resorufin	2004
ECEEM	Maintains the equilibrium of the aptamer-target while separating the components of the equilibrium mixture by capillary electrophoresis	<ul style="list-style-type: none"> Produce alternative way for separation of aptamers with specific predefined K_d Categorize different aptamers based on their K_d Reduce the selection rounds Decrease the selection time 	Produced "smart aptamers" with a predefined K_d value matching the theoretically predicted value	2005
FluMag-SELEX	Magnetic beads-based method using fluorescent labelling for monitoring the affinity and complex separation	<ul style="list-style-type: none"> Rapid separation of bound and unbound molecules Avoid use of radioactive isotopes-labelled libraries 	<ul style="list-style-type: none"> Provided a new method for selecting a target of diverse properties and sizes and linking it to magnetic beads that improved the selection specificity Provided a way to use the aptamers as biosensors 	2005
Non-SELEX	NECEEM-based method in which the PCR amplification step is skipped and the recovered target-DNA complex is incubated with fresh target followed by partitioning	<ul style="list-style-type: none"> Decrease the selection time (~1 h) No PCR step required Produce high-affinity aptamers 	Developed a technique to reduce the selection time while producing aptamers of a 4-fold affinity improvement over the CE-SELEX	2006

CIBLAGE D'UN BIOMARQUEUR PAR UN APTAMÈRE

SELEX Type	Principle	Aim	Application/Result	Year
SPR-SELEX	A method that couples the aptamer or the target to a chip then immobilizes the target or the aptamer and measures the change at the surface upon aptamer-target binding	<ul style="list-style-type: none"> Generate aptamer molecule capable of monitoring molecular interactions between oligonucleotide sequences and its target Eliminate non-specific interaction 	Provided a method to measure the aptamer's real-time binding	2006
TECS-SELEX	Uses modified cells expressing recombinant form of a surface protein that eliminates the need for the purification step	Produce aptamer against ectopic cell surface protein	Produced aptamer against TGF- β type III receptor that is ectopically expressed on CHO cells	2006
<ul style="list-style-type: none"> Genomic SELEX Transcriptomic SELEX 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Genomic SELEX</i>: uses nucleotide library, target proteins, and metabolites from the own organism's genome <i>Transcriptomic SELEX</i>: uses cDNA as a library 	Provide a method to study in vivo oligonucleotide-protein binding	<ul style="list-style-type: none"> <i>Genomic SELEX</i>: identified aptamer that binds and interacts with the global regulator protein Hfq <i>Transcriptomic SELEX</i>: identified aptamer that binds to HEXIM1 protein 	2006 2012
DeSELEX and Convergent selection	Complex SELEX methods where many proteins targets are incubated with the library and then deselecting the dominant-protein bound aptamer and redirecting the selection toward the less abundant protein/s	Shift the selection process toward a specific protein (even a less abundant one) in mixture of different protein complexes	<ul style="list-style-type: none"> Selected aptamer against rare proteins (e.g., procoagulant proteins Factor IX and Factor VII) present in a protein mixture Demonstrated the ability to design aptamers against any protein in the proteome 	2007
MonoLEX	<ul style="list-style-type: none"> One-step selection method Separation of aptamer-target bound complex using affinity chromatography 	<ul style="list-style-type: none"> Minimize SELEX time Produce high-affinity aptamer 	<ul style="list-style-type: none"> Improved aptamer selection through skipping the amplification step Produced aptamer against the Vaccinia virus, which can also be recognized by other orthopox viruses 	2007
NanoSelection® (nM-AFM SELEX)	<ul style="list-style-type: none"> Combines AFM and fluorescence microscopy Uses a binary library of a previously isolated aptamer against the target and nonsense oligonucleotide 	<ul style="list-style-type: none"> Minimize the selection cycles into one Minimize the selection time Small oligonucleotide library can be used 	Developed a method to avoid multiple selection cycles and also select aptamers from small library	2007
ASExp	Uses quenching and dequenching of aptamers	Rapid selection method	Provided a method to rapidly select aptamer for different types of targets	2008

CIBLAGE D'UN BIOMARQUEUR PAR UN APTAMÈRE

SELEX Type	Principle	Aim	Application/Result	Year
FACS-SELEX	Combines in vitro selection with FACS to separate specific cell population	<ul style="list-style-type: none"> Target specific subpopulation of the cells Target suspended cells or primary cells 	Produced aptamer bound to vital Burkitt lymphoma cells	2008
Single microbead SELEX	Reduces the amount of the target molecules and expose them to a single microbead	Produce high affinity aptamer using a single target-conjugated microbead	<ul style="list-style-type: none"> Produced high affinity aptamer toward botulinum neurotoxin Feasibility of monitoring the dissociation constants of each enrichment cycle Reduced selection rounds 	2008
CLADE	In silico aptamer selection method	Rapid aptamer designing method	Identified aptamers against allophycocyanin in silico	2008
In silico selection	In silico secondary structure-based selection followed by a 3D structure prediction and HTP screening of the selected aptamers	<ul style="list-style-type: none"> Select sequence of high potential binding Reduce the library size by four to five orders of magnitude Minimize SELEX time Select high-affinity aptamers 	Provided a computational approach to select aptamers of high-affinity	2009
Tissue slide-based SELEX	In situ SELEX method against paraffin tissue sections	Target clinical tumour markers and provide a way to differentiate between the clinical specimens	<ul style="list-style-type: none"> Produced specific aptamers tightly bind to ductal carcinomas Produced specific aptamers for cancer diagnosis 	2009
Sol-gel SELEX	<ul style="list-style-type: none"> SELEX-on-a-chip selection of aptamer against multiple targets through immobilizing the protein in sol-gel arrays Selective elution triggered by micro-heating 	Produce faster, HTP, efficient, and cheap aptamer	<ul style="list-style-type: none"> Produced high-affinity aptamer against immobilized protein (yeast transcription factor IIB protein and recombinant yeast TATA binding protein) Reduced the selection rounds HTP generation of multiple aptamers in single cycle 	2009
<ul style="list-style-type: none"> Bind-n-Seq Massively parallel SELEX Multiplexed massively parallel SELEX SELEX-seq 	<ul style="list-style-type: none"> Uses next-generation sequencing and extracts motifs from the sequence SELEX-seq combines SELEX with massively parallel sequencing 	<ul style="list-style-type: none"> HTP identification of multiple transcription factors (studying protein-DNA interaction) SELEX-seq: determine the relative DNA binding affinity to any transcription factors 	<ul style="list-style-type: none"> Identified DNA-binding domains of two zinc-finger proteins: Zif268 and Aart Provided in vitro method to analyse protein-DNA interaction SELEX-seq: identified the recognition properties of the DNA upon binding with Extradenticle-Homothorax 	2009 2010 2011
M-SELEX	Target-DNA sample separation is obtained through applying a high voltage	<ul style="list-style-type: none"> Produce high-affinity and high-specificity aptamers Generate aptamer with low K_d Select highest-affinity aptamers on chip Rapid selection 	Provided a fast tool for screening aptamers against any targets	2009
QSAS	Combines M-SELEX with HTS for efficient and rapid aptamer production	Generate aptamer with high efficiency, high affinity, and high specificity	Introduced an integrated method for rapid, high-affinity, and high-specificity generation of aptamer	2010

SELEX Type	Principle	Aim	Application/Result	Year
Cellular-uptake in vivo-variant	Intravenous injection of modified random library into cancerous animal model	Select aptamer for internal target inside the organism depending on cellular uptake	Provided a unique approach to generate aptamer that can specifically localize to tumour cells in vivo	2010
SOMAmers	<ul style="list-style-type: none"> Increases the physicochemical diversity of the library through incorporating chemically modified nucleotides Transforms the protein concentration signature into aptamer concentration signature that can be quantified using DNA microarray 	<ul style="list-style-type: none"> Select high-affinity aptamer of very slow off-rate Detect hundreds of proteins (large-scale proteome analysis) in small sample volumes 	<ul style="list-style-type: none"> Provided a new tool for screening biomarkers Identified 813 proteins with high sensitivity (low detection limit of ~1 pM) Identified two biomarkers for chronic kidney disease 	2010
ISM	In silico post-SELEX genetic algorithm performed to identify aptamers of high-binding affinity	Improve aptamers binding-affinity and specificity	Selected aptamers of high binding affinity and specificity to prostate specific antigen, VEGF, and <i>Proteus mirabilis</i>	2010 2012 2013 2014
μFFE	Applies electric field separation to overcome the limitations of CE-SELEX to separate bound from unbound sequences	<ul style="list-style-type: none"> Increase separation efficacy Generate higher yield from small oligonucleotide library Target immobilization is not required No need for negative selection Decrease the selection time 	Improved the library size by a 300-fold over what CE-SELEX has achieved	2011
HTS-SELEX	One round of positive selection followed by HTS and informatic analysis	<ul style="list-style-type: none"> Produce high-affinity aptamer in one positive selection round Does not require tedious work 	Identified aptamers that can bind to thrombin in nM range	2011
One-step selection Method	One-step selection of target-immobilized coverslip followed by library binding, extensive washing, and amplification step	<ul style="list-style-type: none"> One-step rapid selection method Has low binding affinity 	Provided a rapid one-step generation of aptamer against α -bungarotoxin	2012
Cell-internalization SELEX	Combines cell-SELEX with HTS and bioinformatics	Produce aptamers of high intracellular internalization	Provided a new approach to design aptamers that capable of internalizations into the cytoplasm of vascular smooth muscle cells	2012
Capture-SELEX (FluMag-based)	Immobilization of specific aptamers library on magnetic beads using a docking sequence linked to the library	<ul style="list-style-type: none"> Select aptamer against small organic molecules Select aptamers for solute targets 	Provided a method to select aptamer against small molecule (e.g., kanamycin A)	2012

SELEX Type	Principle	Aim	Application/Result	Year
Domain targeted SELEX	Uses recombinant protein containing chemokine domain (to extend protein accessibility) immobilized onto magnetic agarose beads	Select aptamer against specific protein's unfolded domain	Developed aptamer to Fractalkine protein	2012
<ul style="list-style-type: none"> ■ GO-SELEX ■ Immobilization free SELEX 	Uses π - π stacking and adsorption of ssDNA on 2D GO sheets to separate unbound DNA	Generation of high-affinity, cost-effective, and target-immobilization-free SELEX	Produced aptamer to Nampt protein without target immobilization	2012
MAI-SELEX	A selection method to recognize two separate sites on the target using 2'-fluoro-modified library	Target distinct sites/subunits of the protein	Produced two aptamers that recognize the α V or β 3 subunits of integrin α V β 3	2012
RAPID-SELEX	<ul style="list-style-type: none"> ■ Skips PCR amplification step ■ Uses affinity microcolumns 	Reduce selection time	Identified aptamer to CHK2 and UBLCP1 in one-third of the time required for the conventional selection	2013
Expanded genetic alphabet (Ds-base)	Uses a library containing natural nucleotides and other three unnatural nucleotides with a hydrophobic base	Increase sequence diversity and so expand SELEX selection power	Generated aptamers that bind to VEGF165 and interferon- γ with more than 100-fold improved affinity	2013
AEGIS-SELEX	Uses unnatural forms of nucleotides, nonstandard P and Z, beside the normal four bases-based library (GACTZP DNA library)	<ul style="list-style-type: none"> ■ Increase sequence diversity and so expand the selection power ■ Generate high-affinity aptamer capable of binding to hydrophobic cavities of the protein ■ Generate aptamers of small K_d, higher sequence variation, and multiple folds 	Produced ZAP-2012 aptamer that can bind to MDA-MB-231 with 10-fold higher affinity than achieved using the conventional aptamers	2014
ES-SELEX	<ul style="list-style-type: none"> ■ Directly selects aptamer for the target protein subunit in its native structure ■ Uses specific target competitors to elute the aptamer already bound to the target 	Generate epitope-specific aptamer of a native protein structure	Produced anti-sialic acid receptor aptamers that inhibit hemagglutination at pM range	2014
MARAS	Selects aptamers with different affinities to the target molecule using magnetic beads and external rotating magnetic field	Select aptamers based on their different binding affinities	Produced aptamer with high affinity to C-reactive protein	2014
Particle Display	Measures the affinity of each aptamer sequence in the library and sorting them using HTS. Then isolating the highest-affinities candidates using FACS	Generate high-affinity, simple, rapid, and cost-effective aptamers	Measured the affinity of 100 million aptamers and obtained high-affinity aptamers for thrombin, ApoE, PAI-1, and 4-1BB proteins	2014
MSD-SELEX	Uses a library of monoclonal DNA-displaying beads	Generate high-affinity and rapid aptamers	Obtained high-affinity aptamers against EpCAM and aflatoxin B1	2014

SELEX Type	Principle	Aim	Application/Result	Year
Yeast surface display-SELEX	Target protein is loaded on the surface of yeast	Quick and unexpansive HTS identification of DNA-binding sites of the proteins without prior knowledge of the target site	Provided a way to determine aptamer-protein binding specificity	2014
Hi-Fi SELEX	Introduces fixed-region blocking elements to enhance the functional diversity of the library	<ul style="list-style-type: none"> ■ Provide a functional diverse library ■ Eliminate non-specific sequences remaining through the selection process ■ Decrease the selection rounds 	Identified aptamers of K_d in nM range to α -thrombin	2015
Click-SELEX	Uses copper(I)-catalysed alkyne-azide cycloaddition modified nucleic acid libraries	Generate modified nucleobases that increase binding capabilities	<ul style="list-style-type: none"> ■ Provided a new method to produce novel aptamers called "clickmers" that can specifically recognize C3-GFP ■ Increased the recognition properties 	2015
Icell SELEX	<ul style="list-style-type: none"> ■ Produces aptamers to cell surface proteins using isogenic cell lines by manipulating them for positive-selection and counter-selection ■ Controls isogenic cell protein expression by silencing (during counter-selection) and overexpression (during positive-selection) 	Target various membrane proteins through successful manipulation of the endogenous expression of the target proteins	Produced aptamer to integrin alpha V	2016
LIGS	Uses antibody bound to antigen for the partitioning step to compete with aptamers from partially enriched SELEX	Identify highly-specific aptamer sequences that outcompeting with specific antibody for selecting highly specific aptamers	Identified three aptamers that outcompete with mIgM antibody	2016
Colorimetric dye-displacement SELEX	Uses target-induced displacement of a small-molecule dye to isolate signal-producing aptamers triggered by binding to the target	Develop an efficient and rapid way to isolate small molecules through colorimetric dye-displacement	Provided a new way of sensitive target isolation based on Cy7-displacement colorimetric assay	2018
Open qPCR SELEX	Uses open qPCR to quantify target-aptamer binding	<ul style="list-style-type: none"> ■ Simple, efficient, and low-cost selection method ■ Avoid under- or over-amplification steps 	Produced aptamers against whole Drosophila C virus particles	2018

Abréviations : AEGIS-SELEX, artificially expanded genetic information systems SELEX; AFM, atomic force microscopy; ASEp, aptamer selection express; CE-SELEX, capillary electrophoresis SELEX; CLADE, closed loop aptameric directed evolution; ECEEM, equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures; EMSA-SELEX, electrophoretic mobility shift assay SELEX; ES-SELEX, epitope-specific SELEX; FACS-SELEX, fluorescence-activated cell sorting SELEX; GO-SELEX, graphene oxide SELEX; Hi-Fi SELEX, high-fidelity SELEX; HTS, high-throughput sequencing; HTP, high-throughput; Icell SELEX, isogenic cell SELEX; ISM, in silico maturation; LIGS, ligand-guided selection; MAI-SELEX, multivalent aptamer isolation; MARAS, magnetic-assisted rapid aptamer selection; μ FEE, micro free-flow electrophoresis; MP, minimal primer selection; MSD-SELEX, monoclonal surface display SELEX; M-SELEX, microfluidics SELEX; NECEEM, non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures; PF, primer-free selection; QSAS, quantitative selection of aptamers through sequencing; RAPID-SELEX, RNA aptamer isolation via dual-cycles SELEX; SELEX, systematic evolution of ligands by exponential enrichment; SOMAmers, slow off-rate modified aptamer; SPR, surface plasmon resonance; SweepCE, sweeping capillary electrophoresis; TECS-SELEX, target expressed on cell surface SELEX.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) Thomas GAGNOL

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

21101000

29

N° Étudiant :

N° Thèse :

Nom et Prénom : **GAGNOL THOMAS**

Sujet : **Ciblage d'un biomarqueur à l'aide d'un aptamère : cas du marqueur
tumoral DDR2 dans le mélanome métastatique.**
.....
.....

21/07/2020

Tours, le :

Le(s) Directeur(s) de Thèse :

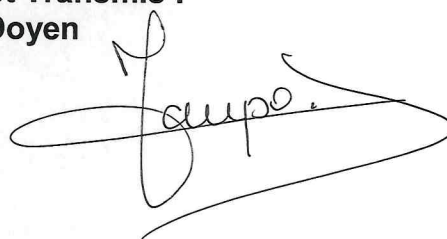
Laurent AZEMA



Marc CLASTRE



**Vu et Transmis :
Le Doyen**



GAGNOL THOMAS	N°29
Ciblage d'un biomarqueur à l'aide d'un aptamère : Cas du marqueur tumoral DDR2 dans le mélanome métastatique	
<p>RÉSUMÉ DE LA THÈSE</p> <p>L'identification et le ciblage des biomarqueurs sont essentiels pour l'étude et le suivi de nombreuses pathologies, ainsi que pour le développement de nouveaux outils thérapeutiques et diagnostiques. Les aptamères sont des séquences oligonucléotidiques ayant la capacité de fixer une cible grâce à une conformation tridimensionnelle spécifique. Ils appartiennent à une classe émergente de biosenseurs développés pour le ciblage de différents marqueurs biologiques tel que les marqueurs tumoraux, les toxines ou les métabolites. Leur obtention est réalisée grâce à la méthode SELEX (Systematic Evolution of Ligand by Exponential enrichment) dont l'objectif est de sélectionner, à partir d'une banque aléatoire, les séquences-ligands dont la spécificité et l'affinité sont les plus élevées pour la cible d'intérêt.</p> <p>L'objectif de cette thèse est de présenter la technologie des aptamères et leur méthode de sélection, en s'appuyant sur l'exemple de la sélection de séquences-candidates dirigées contre le marqueur tumoral DDR2, présent à la surface des cellules tumorales du mélanome métastatique. Cela nous mènera à une réflexion sur les avancées effectuées dans le développement des aptamères, sur les différentes perspectives en matière d'optimisation des séquences-candidates et d'améliorations de la technique de sélection et sur de futures applications dans les domaines médico-pharmaceutiques.</p>	
Aptamères ; SELEX ; Biomarqueur ; Mélanome métastatique.	
<p><u>JURY</u></p> <p>PRÉSIDENT : M. CLASTRE Marc, Professeur, Université de Tours, TOURS</p> <p>MEMBRES :</p> <p>M. AZEMA Laurent, Maître de conférences, Université de Bordeaux, BORDEAUX</p> <p>Mme BERQUEBESTEL Isabelle, Pharmacien, Professeur, Université de Bordeaux, BORDEAUX</p> <p>Mme DUCEUX Margot, Pharmacien, SH Consulting, TOURS</p>	
Le 21 juillet 2020 à la Faculté de Pharmacie Philippe-Maupas	