



HAL
open science

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

Marie Girardot

► **To cite this version:**

Marie Girardot. Aptamères et électrophorèse capillaire : caractérisation physico-chimique d'aptamères libres en solution ou greffés sur des nanoparticules, et étude de leur affinité avec une cible protéique en vue de leur emploi pour des méthodes sensibles de diagnostic. Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2010. Français. NNT : . pastel-00553765

HAL Id: pastel-00553765

<https://pastel.hal.science/pastel-00553765>

Submitted on 9 Jan 2011

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

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

ANNEXES

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

Spécialité : Chimie Analytique

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

Présentée par :

Marie GIRARDOT

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

Table des matières

ANNEXE 1 : CARACTERISATION DE L'APTAMERE ANTI-LYSOZYME PAR CE-ESI/MS..... 4

1. INFUSION DIRECTE.....	5
1.1. Optimisation de la tension de fragmentation.....	5
1.2. Analyse du spectre de masse de l'aptamère	6
2. MIGRATION ELECTROPHORETIQUE	7

ANNEXE 2 : ETUDE DE L'INTERACTION ENTRE L'APTAMERE ANTI-LYSOZYME ET LE MAGNESIUM PAR ANALYSE FRONTALE ELECTROKINETIQUE CONTINUE (FACCE)..... 10

1. ETALONNAGE DE LA HAUTEUR DU PALIER DE CONCENTRATION DE L'APTAMERE.....	10
2. ETUDE DE L'INTERACTION APTAMERE – MAGNESIUM PAR FACCE	12

ANNEXE 3 : ETUDE DE L'INTERACTION APTAMERE – THROMBINE PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE D'AFFINITE (ACE) 15

1. DESCRIPTION ET PROPRIETES DE LA THROMBINE.....	15
2. CARACTERISATION DES CONSTITUANTS DU SYSTEME PAR ELECTROPHORESE DE ZONE	16
2.1. Caractérisation de la thrombine.....	16
2.2. Caractérisation de l'aptamère anti-thrombine.....	18
2.3. Injection directe du mélange aptamère – thrombine	20
3. DETERMINATION DES PARAMETRES DE L'INTERACTION APTAMERE – THROMBINE PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE D'AFFINITE.....	21
3.1. Injection de la thrombine (lot n°1)	22
3.1.1. Influence de la concentration en magnésium sur le profil de la thrombine	22
3.1.2. Mise en œuvre de l'électrophorèse capillaire d'affinité	24
3.1.3. Correction de la mobilité électrophorétique.....	24
3.1.4. Exploitation des résultats	27
3.2. Injection de l'aptamère.....	29
3.2.1. Influence de la concentration en magnésium sur le profil de l'aptamère	29
3.2.2. Mise en œuvre de l'électrophorèse capillaire d'affinité	30
3.2.3. Exploitation des résultats	31
3.3. Comparaison des deux configurations	33
3.4. Etude complémentaire du lot n°2 de thrombine	33
3.4.1. Mise en œuvre de l'électrophorèse capillaire d'affinité	33
3.4.2. Exploitation des résultats	35
3.4.3. Prise en compte de l'effet de force ionique.....	37
3.4.4. Effet de la concentration en magnésium	40
4. CONCLUSION	40
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	41

ANNEXE 4 : ETUDE DE L'INTERACTION APTAMERE – LYSOZYME PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE AVEC DETECTION UV..... 42

1. ETUDE DE L'INTERACTION APTAMERE – LYSOZYME PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE D'AFFINITE (ACE) 42	
1.1. ACE en capillaire HPC	42
1.1.1. Mise en œuvre expérimentale	43
1.1.2. Exploitation des résultats	44
1.2. ACE en capillaire HPC avec mesure simultanée de m_{eo} et m_{AL}	46
1.2.1. Mise en œuvre expérimentale	46
1.2.2. Exploitation des résultats	47
2. ETUDE DE L'INTERACTION APTAMERE – LYSOZYME PAR ANALYSE FRONTALE ELECTROKINETIQUE CONTINUE (FACCE)	49

2.1. Etalonnage de la hauteur du palier de concentration de l'aptamère	49
2.2. Etude de l'interaction aptamère – lysozyme par FACCE.....	51
2.2.1. Injection de mélanges contenant une concentration variable d'aptamère et une concentration constante de lysozyme	52
2.2.2. Injection de mélanges contenant une concentration constante en aptamère et une concentration variable de lysozyme	54
3. CONCLUSION	58

ANNEXE 5 : DETERMINATION DES PARAMETRES D'INTERACTION NON-COVALENTE EN SOLUTION PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE 59

1. INTRODUCTION.....	59
2. DETERMINATION DE PARAMETRES D'INTERACTION PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE D'AFFINITE (ACE) .	60
2.1. Principe de l'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE)	60
2.2. Détermination des paramètres d'interaction dans le cas d'une interaction monomoléculaire.....	61
2.2.1. Isotherme d'adsorption et formes linéarisées	61
2.2.2. Correction de viscosité	62
2.2.3. Cas des cinétiques lentes	62
2.2.4. Méthodes de remplissage partiel du capillaire.....	63
3. DETERMINATION DE PARAMETRES D'INTERACTION PAR ANALYSE FRONTALE ELECTROKINETIQUE CONTINUE (FACCE)	63
3.1. Principe de l'analyse frontale électrocinétique continue (FACCE).....	63
3.2. Détermination des paramètres d'interaction.....	64
3.2.1. Cas général de l'adsorption de ligands sur un substrat	64
3.2.2. Modèle multi-sites [6].....	65
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	68

ANNEXE 6 : COMPOSITION DES DIFFERENTS ELECTROLYTES DE SEPARATION UTILISES . 69

Annexe 1

Caractérisation de l'aptamère anti-lysozyme par CE-ESI/MS

L'aptamère dirigé contre le lysozyme est un oligonucléotide ADN de 30 bases dont voici la séquence : 5'-ATC AGG GCT AAA GAG TGC AGA GTT ACT TAG-3'. Sa masse moléculaire est de 9320 Da. Afin de visualiser le spectre de masse de l'aptamère, l'électrophorèse capillaire a été couplée à une détection par spectromètre de masse (MS) à analyseur quadripolaire, via une interface d'électronébulisation (ESI) à liquide additionnel coaxial. Cette interface se présente sous la forme de trois capillaires concentriques coaxiaux (Figure 1) : le capillaire en silice vierge utilisé pour la séparation électrophorétique est entouré par deux capillaires en acier inoxydable (capillaire central et capillaire externe) assurant respectivement l'écoulement du liquide additionnel et du gaz nébulisant (air ou azote) favorisant le processus d'évaporation des ions lors de l'électronébulisation. L'ajout d'un liquide additionnel permet d'augmenter le débit du fluide sortant du capillaire de séparation (de l'ordre de quelques centaines de nL/min) afin d'atteindre des débits compatibles avec le spectromètre de masse (de l'ordre de quelques μ L/min). L'ionisation de l'aptamère, chargé négativement du fait de la présence de groupements phosphate sur les bases nucléiques, est réalisée en mode négatif ; un faible pourcentage (0,1%) de triéthylamine (TEA) est donc introduit dans le liquide additionnel hydro-organique (méthanol-eau 50:50) afin de favoriser l'ionisation de l'aptamère.

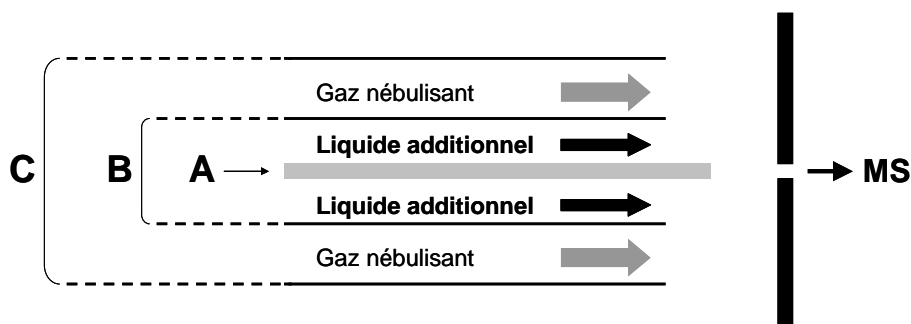


Figure 1 : schéma de l'interface à liquide additionnel coaxial pour le couplage CE/ESI-MS [1]. A : capillaire de séparation CE en silice vierge ; B : capillaire central pour l'écoulement du liquide additionnel ; C : capillaire externe pour l'écoulement du gaz nébulisant.

L'appareillage utilisé est un système HP^{3D}CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne) équipé d'un détecteur à barrette de diodes, couplé à un spectromètre de masse simple quadrupole Agilent Series 1100 MSD (Agilent Technologies) via une interface ESI à liquide additionnel coaxial (Agilent Technologies). Le liquide additionnel est acheminé vers l'interface par une pompe HPLC isocratique Agilent Series 1100. Les données sont traitées à l'aide du logiciel HPChemstation.

1. Infusion directe

Une solution aqueuse d'aptamère anti-lysozyme à 200 μ M a été infusée (i.e. poussée par pression) directement dans le spectromètre de masse, via un capillaire en silice vierge. La détection du front de l'aptamère est réalisée simultanément par absorbance UV sur l'appareil de CE, et par MS en mode balayage de 500 à 2000 m/z. L'intégration du massif obtenu en mode balayage permet d'accéder au spectre de masse de l'aptamère.

1.1. Optimisation de la tension de fragmentation

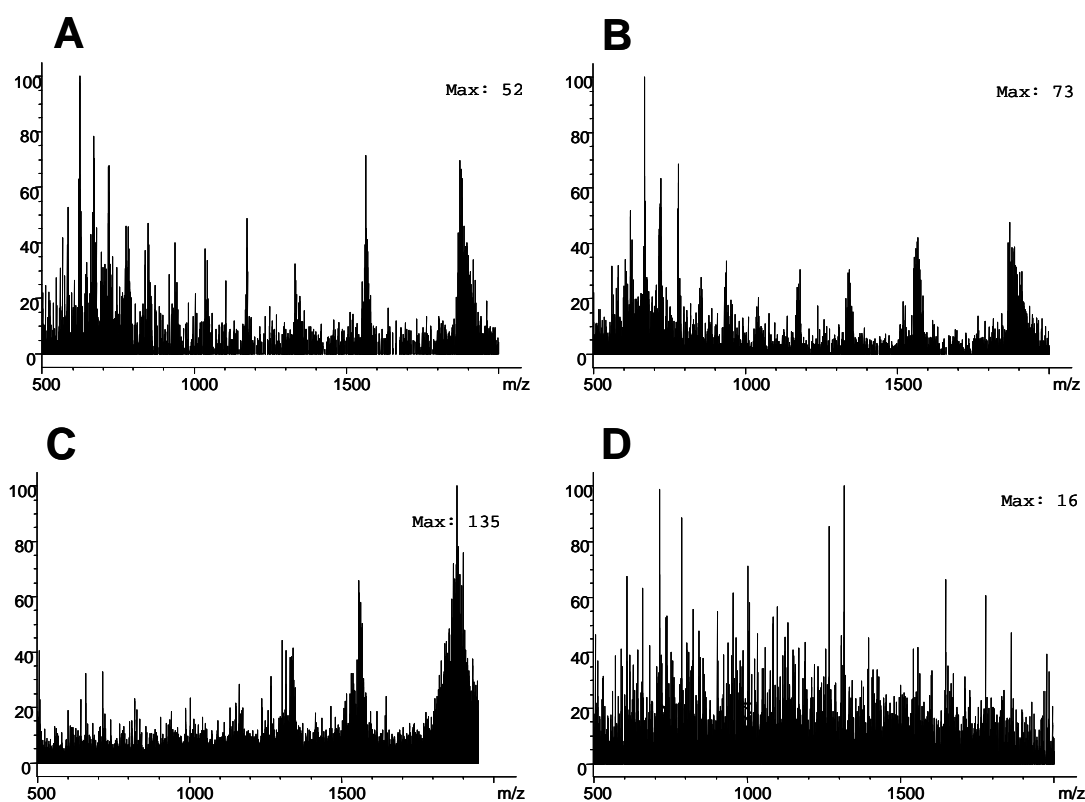


Figure 2 : spectre de masse de l'aptamère obtenu en CE-ESI/MS par infusion directe, en appliquant une tension de fragmentation de 50 V (A), 100 V (B), 200 V (C) ou 400 V (D). Capillaire en silice vierge : 50 μ m de diamètre interne, 80 cm de longueur totale (détection UV 20 cm). Echantillon : solution aqueuse d'aptamère anti-lysozyme 200 μ M. Température : 25°C. Détection UV : 200, 254 et 280 nm. Détection MS : mode négatif, balayage 500 – 2000 m/z. Liquide additionnel : eau/MeOH 50:50 + TEA 0,1%, débit 4 μ L/min. Gaz nébulisant

(azote) : 8 psi. Gaz séchant (azote) : 350°C, 7 L/min. Paramètres d'acquisition : pas de 0,30 ; largeur de pic 0,3 min ; temps de pause 880 ms ; balayage rapide. Tension de fragmentation : 50 V (A), 100 V (B), 200 V (C) ou 400 V (D).

Une tension de fragmentation (également appelée tension de cône) comprise entre 50 et 400 V a été imposée afin d'étudier son influence sur l'allure des spectres de masse obtenus (Figure 2). Pour une tension de fragmentation de 50 ou 100 V, un spectre de masse caractéristique de l'aptamère est observé (Figure 2A et B). Le maximum d'abondance est légèrement supérieur à 100 V par rapport à 50 V (73 et 52, respectivement) ; en outre, le spectre obtenu à 100 V semble mieux résolu. En revanche, lorsque la tension de fragmentation est supérieure ou égale à 200 V, le spectre n'est plus observé (Figure 2C et D), sans doute du fait d'une dégradation trop importante de la molécule. La tension de fragmentation optimale a donc été fixée à 100 V.

Il est à noter que le maximum d'absorbance dans ces conditions d'analyse est très faible, dénotant une mauvaise sensibilité qui peut partiellement s'expliquer par l'ionisation en mode négatif. La limite de détection est estimée à 50 μM , contre environ 2 μM en absorbance UV, soit une sensibilité 25 fois plus faible.

1.2. Analyse du spectre de masse de l'aptamère

Le spectre de masse de l'aptamère a été enregistré dans les conditions précédentes, en fixant la tension de fragmentation à 100 V (Figure 3).

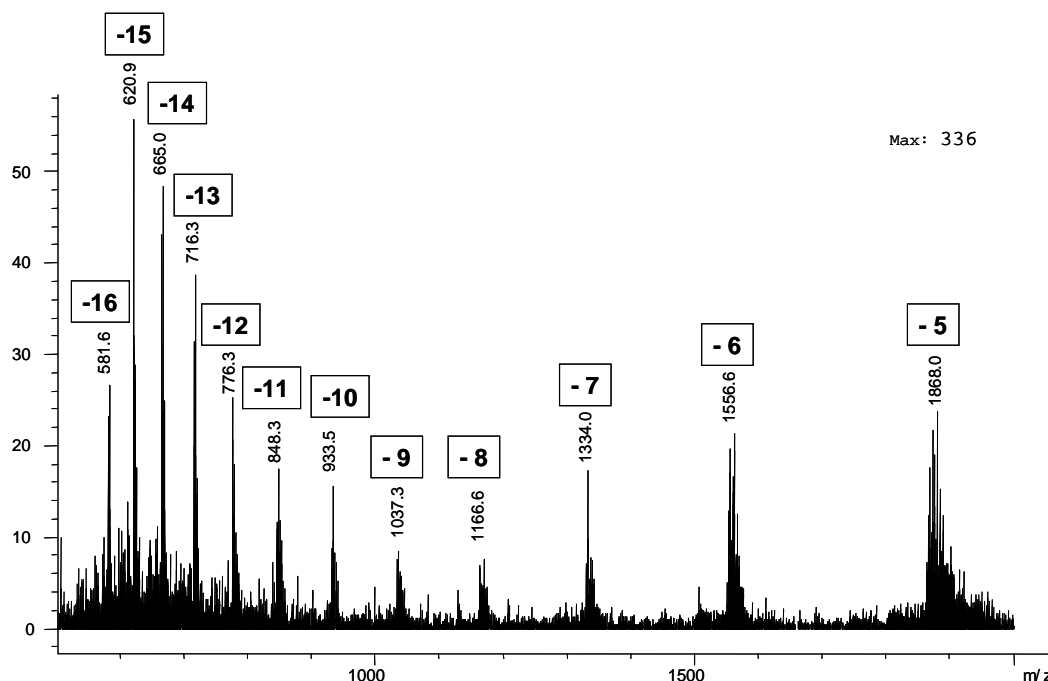


Figure 3 : spectre de masse de l'aptamère obtenu en CE-ESI/MS par infusion directe. Conditions : cf. Figure 2, sauf tension de fragmentation : 100 V.

Celui-ci correspond bien au spectre théorique calculé pour la gamme balayée (Tableau 1).

Tableau 1 : spectre de masse théorique de l'aptamère anti-lysozyme (M = 9320 Da) entre 500 et 200 m/z.

z	-5	-6	-7	-8	-9	-10	-11	-12	-13	-14	-15	-16
m/z théo	1863	1552	1330	1166	1034	931	846	776	716	664	620	581

Pour chaque m/z, on observe un massif constitué d'un ensemble de pics, ce qui pourrait provenir de la formation d'adduits avec les éventuels sels, issus de l'étape de synthèse et/ou de purification et présents à l'état de traces dans la solution d'aptamère. Le calcul du surplus de masse par rapport à la masse théorique de l'aptamère (9320 Da) suggère notamment l'existence d'adduits avec le sodium ($M = 23,0 \text{ g.mol}^{-1}$), le calcium ($M = 40,1 \text{ g.mol}^{-1}$) et la TEA ($M = 101,2 \text{ g.mol}^{-1}$) (Tableau 2).

Tableau 2 : attribution des pics du massif correspondant à un taux de charge de -9

z	m/z	Masse (Da)	Surplus	Adduit
9	1037,3	9344,7	24,7	Na
9	1040	9369	49	Ca
9	1046,3	9425,7	105,7	TEA

Les conditions dénaturantes employées pour l'analyse de l'aptamère (présence d'un liquide additionnel hydro-organique) sont défavorables à l'étude des interactions non covalentes. La détection du complexe aptamère/cible en CE-ESI/MS nécessite donc l'emploi d'un liquide additionnel non dénaturant, tel que l'eau pure, ce qui a pour effet de diminuer l'efficacité de l'ionisation et donc la sensibilité de la détection MS. Au vu de la très faible abondance obtenue en conditions dénaturantes, cette approche n'a donc pas été envisagée pour l'analyse de l'aptamère.

2. Migration électrophorétique

Une petite zone d'aptamère a ensuite été injectée afin d'effectuer sa migration électrophorétique dans un tampon formiate de sodium 10 mM (pH 8,9) compatible avec le spectromètre de masse. La détection MS s'effectue dans les conditions optimales définies précédemment, en enregistrant simultanément un signal en mode balayage 500 – 2000 m/z et deux signaux en mode d'ion sélectionné (SIM) pour m/z = 620,9 et 666,8 (correspondant à des taux de charge de -15 et -14, respectivement). Les profils obtenus sont présentés Figure 4.

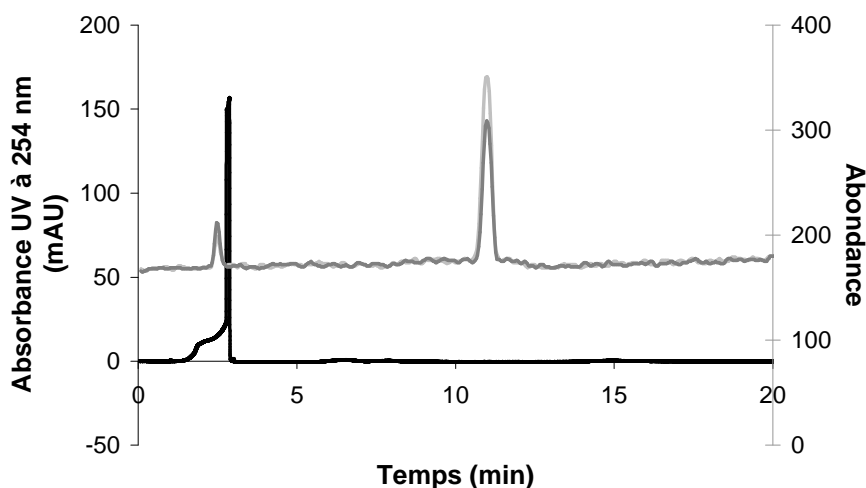


Figure 4 : profil électrophorétique de l'aptamère obtenu en détection UV à 254 nm (noir) ou SIM à $m/z = 620,9$ (gris foncé) et $666,8$ (gris clair). Capillaire en silice vierge : 50 μm de diamètre interne, 80 cm de longueur totale (détection UV 20 cm). Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de formamide 0,05%. Echantillon : solution aqueuse d'aptamère anti-lysozyme 200 μM . Electrolyte de séparation : formiate de sodium 10 mM (pH 8,9). Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars, 3s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +30 kV. Température : 25°C. Détection UV : 254 nm. Détection MS : mode négatif, balayage 500 – 2000 m/z + SIM 620,9 et 666,8. Liquide additionnel : eau/MeOH 50:50 + TEA 0,1%, débit 4 $\mu\text{L}/\text{min}$. Gaz nébulisant : 8 psi. Gaz séchant : 350°C, 7 L/min. Paramètres d'acquisition : pas de 0,30 ; largeur de pic 0,3 min ; temps de pause 880 ms ; balayage rapide. Tension de fragmentation : 100 V.

Huit injections successives ont été réalisées afin de tester la répétabilité des mobilités, des aires et des abondances (Tableau 3). Le marqueur neutre utilisé (formamide) n'étant pas détecté en MS ($m/z < 50$), la détermination de la mobilité électroosmotique est effectuée en détection UV à 200 nm. La mobilité apparente de l'aptamère présente une faible déviation standard ($< 3\%$) quel que soit le mode de détection, ce qui traduit une répétabilité tout à fait acceptable. La mobilité apparente déterminée en mode SIM est comparable, quoique légèrement supérieure à celle obtenue en détection UV (+6%). Le rapport des temps de migration obtenus en détection MS et UV (respectivement ~ 10 min et $\sim 2,5$ min, soit un rapport de 4) correspond au rapport des longueurs effectives (respectivement 80 et 20 cm). Les pics obtenus en mode SIM présentent des valeurs d'abondance très dispersées (RSD 25-30%). Cette dispersion peut s'expliquer en partie par la répétabilité médiocre de l'injection, révélée par la dispersion des aires obtenues en détection UV (RSD 14%).

Tableau 3 : étude de la répétabilité des mobilités, des aires (détection UV) et des abondances (détection MS en mode SIM). Conditions opératoires : cf. Figure 4.

Détection	m_{eo} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	m_{ep} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	m_{app} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Aire du pic à 254 nm ou abondance
UV 200 nm	$91,8 \pm 0,8$	$- 63,0 \pm 1,2$	$28,8 \pm 0,9$	$2023,5 \pm 279,7 \text{ mAU} \cdot \text{min}$
SIM $m/z = 620,9$	-	-	$30,5 \pm 0,7$	$112,2 \pm 34,7$
SIM $m/z = 666,8$	-	-	$30,6 \pm 0,8$	$141,1 \pm 34,7$

Ces résultats indiquent la faisabilité d'une caractérisation et quantification de l'aptamère par CE-ESI-MS en conditions dénaturantes. La sensibilité dans les conditions actuelles ne semble cependant pas permettre la quantification pour une concentration en aptamère sub-micromolaire.

[1] Mokaddem, M., *Couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse via une interface à électronébulisation : compréhension des phénomènes à l'interface et développement de nouvelles méthodologies pour des échantillons complexes et pour les séparations par focalisation isoélectrique*, Thèse, Université Pierre et Marie Curie, Paris 2008, p. 29.

Annexe 2

Etude de l'interaction entre l'aptamère anti-lysozyme et le magnésium par analyse frontale électrocinétique continue (FACCE)

Les paramètres de l'interaction entre l'aptamère anti-lysozyme et le magnésium ont été déterminés par analyse frontale électrocinétique continue (FACCE) dans des conditions similaires à celles employées précédemment en électrophorèse capillaire d'affinité (ACE). L'injection électrocinétique continue de l'aptamère (20 μM) incubé avec une concentration croissante de magnésium (gamme 0,25 – 10 mM) a été réalisée, dans un électrolyte MOPS/NaOH 30 mM (pH 7,0). Le capillaire est modifié par un polymère neutre, l'hydroxypropylcellulose (HPC), afin de supprimer le flux électroosmotique (cf. article). La détection étant réalisée par absorbance UV, seul l'aptamère peut être détecté, le magnésium étant transparent en détection UV-visible. Une tension négative (-10 kV) est donc appliquée, conduisant à l'apparition du front de l'aptamère libre.

1. Etalonnage de la hauteur du palier de concentration de l'aptamère

Dans un premier temps, nous avons vérifié la linéarité de la hauteur des paliers de concentration de l'aptamère libre en fonction de sa concentration dans le mélange injecté. Pour cela, l'aptamère anti-lysozyme seul a été injecté en mode FACCE, dans les conditions décrites précédemment, à trois niveaux de concentration différentes : 5, 10 et 20 μM . Le palier de concentration obtenu étant parfaitement horizontal (Figure 5), la détermination de sa hauteur est effectuée sans ambiguïté.

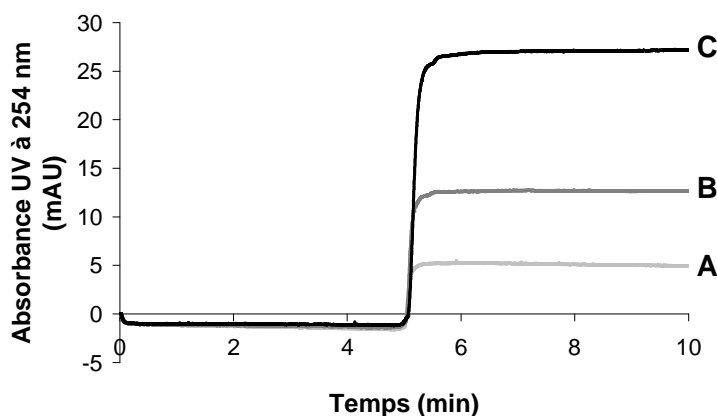


Figure 5 : électrophérogrammes obtenus par injection électrocinétique continue de l'aptamère (mode FACCE) à différentes concentrations : 5 μM (A), 10 μM (B) et 20 μM (C). Capillaire modifié HPC : 50 μm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Echantillon : solution d'aptamère anti-lysozyme 5 μM (A), 10 μM (B) et 20 μM (C) dilué dans l'électrolyte de séparation. Electrolyte de séparation : MOPS/NaOH 30 mM (pH 7,0). Injection électrocinétique continue. Tension appliquée : -10 kV ($I = 11 \mu\text{A}$). Température : 25°C. Détection UV : 254 nm.

Afin de tester la répétabilité de la mesure, trois séries d'échantillons sont préparées par dilutions successives (soit 9 échantillons en tout), et trois mesures successives sont réalisées par échantillon. Les données obtenues conduisent pour les trois séries à des droites de régression linéaire de coefficient de corrélation $R^2 \geq 0,9998$: la hauteur du palier mesurée peut donc être considérée comme proportionnelle à la concentration en aptamère dans l'échantillon injecté. Si la répétabilité des mesures réalisées sur un même échantillon est très satisfaisante ($CV < 2,5\%$), elle est un peu plus faible entre les échantillons issus de séries différentes mais reste correcte ($CV < 10\%$). La moyenne des mesures sur les trois séries (soit 9 mesures par niveaux de concentration, réalisées sur 3 échantillons différents) conduit à une droite de régression linéaire d'équation : $y = 1,0427x - 1,3167$ avec $R^2 = 0,9998$ (Figure 6). Cette droite d'étalonnage permettra de calculer la concentration en aptamère libre lors de la détermination de la constante d'interaction avec le magnésium.

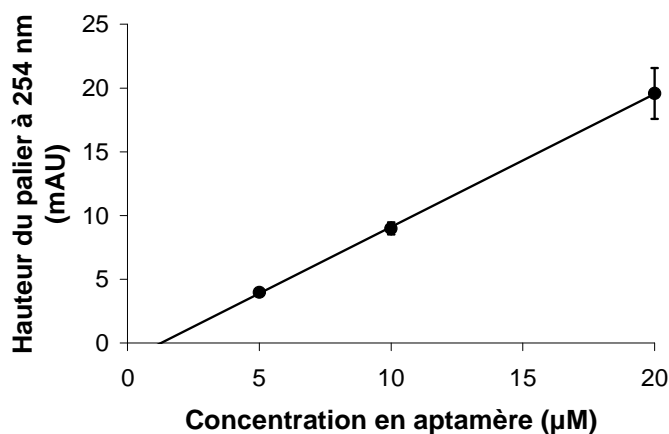


Figure 6 : corrélation entre la hauteur du palier de concentration de l'aptamère anti-lysozyme et la concentration en aptamère injectée. Trois séries de 3 niveaux de concentration (5, 10 et 20 μM), 3 répétitions

par échantillons. Moyenne sur les 3 séries pour chaque niveau de concentration. Equations de la droite de régression linéaire ($n = 3$) : $y = 1,0427x - 1,3167$ ($R^2 = 0,9998$). Conditions : cf. Figure 5.

2. Etude de l'interaction aptamère – magnésium par FACCE

Des mélanges aptamère – magnésium, de concentration constante en aptamère (20 μM) et de concentrations variables, réparties en 8 niveaux, en MgCl_2 (de 0,25 à 10 mM) ont été préparés dans l'électrolyte MOPS/NaOH 30 mM (pH 7,0) puis analysés par électrophorèse capillaire en mode FACCE. Afin de garantir la continuité de la conductivité du milieu entre l'échantillon et l'électrolyte, le magnésium est ajouté dans l'électrolyte de séparation à une concentration identique à celle de l'échantillon. Les électrophérogrammes obtenus se composent d'un front de migration prolongé d'un palier de concentration horizontal, attribué à l'aptamère libre présent dans le mélange, dont la hauteur diminue lorsque la proportion de magnésium augmente (Figure 7). Parallèlement, on observe un décalage du front vers les temps de migration élevés, qui reflète la diminution de mobilité électrophorétique de l'aptamère liée à l'augmentation de la force ionique globale du milieu.

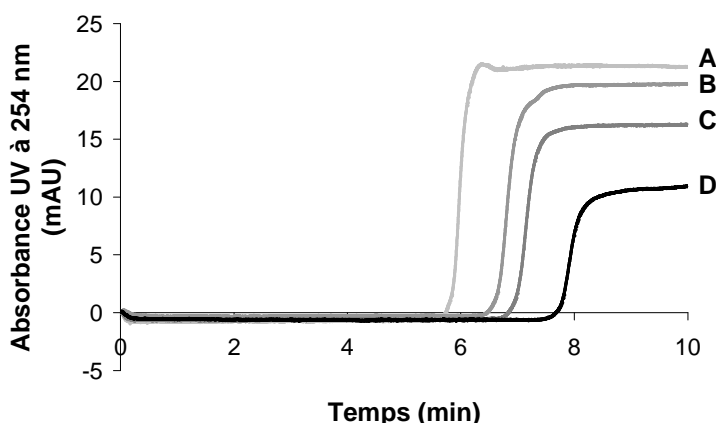


Figure 7 : électrophérogrammes obtenus par injection en mode FACCE de mélanges aptamère 20 μM - magnésium 0,25 mM (A), 0,5 mM (B), 1 mM (C) et 10 mM (D). Capillaire modifié HPC : 50 μm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Echantillon mélange aptamère anti-lysozyme 20 μM + MgCl_2 0 – 10 mM, incubé dans l'électrolyte de séparation. Electrolyte de séparation : MOPS/NaOH 30 mM (pH 7,0) avec MgCl_2 (0 – 10 mM). Injection électrocinétique continue. Tension appliquée : -10 kV ($I = 11 \mu\text{A}$). Température : 25°C. Détection UV : 254 nm

La concentration en aptamère libre est calculée en utilisant la droite d'étalonnage établie précédemment (Figure 6). Les données expérimentales ont été exploitées en faisant jouer à l'aptamère le rôle de substrat et au magnésium celui de ligand. La concentration en magnésium libre n'étant pas directement accessible, celle-ci doit d'abord être déterminée via une estimation directe des paramètres d'interaction (optimisation du taux d'association n de façon à minimiser l'écart-type sur les constantes calculées pour chaque composition du

système). L'isotherme d'adsorption (Figure 8A) et ses formes linéarisées (x-réciproque ou représentation de Scatchard, y-réciproque et double-réciproque) (Figure 8B-D) sont obtenues via les équations établies dans l'Annexe 5. Ces différentes méthodes de linéarisation permettent d'estimer les paramètres de l'interaction aptamère – magnésium (Tableau 4). Une constante de dissociation (k_d) de $1,3 \pm 0,4$ mM est obtenue, ce qui est cohérent avec les valeurs déterminées par électrophorèse capillaire d'affinité ($3,1 \pm 0,2$ mM [61]). Le nombre de sites sur l'aptamère, n , est de $0,61 \pm 0,10$.

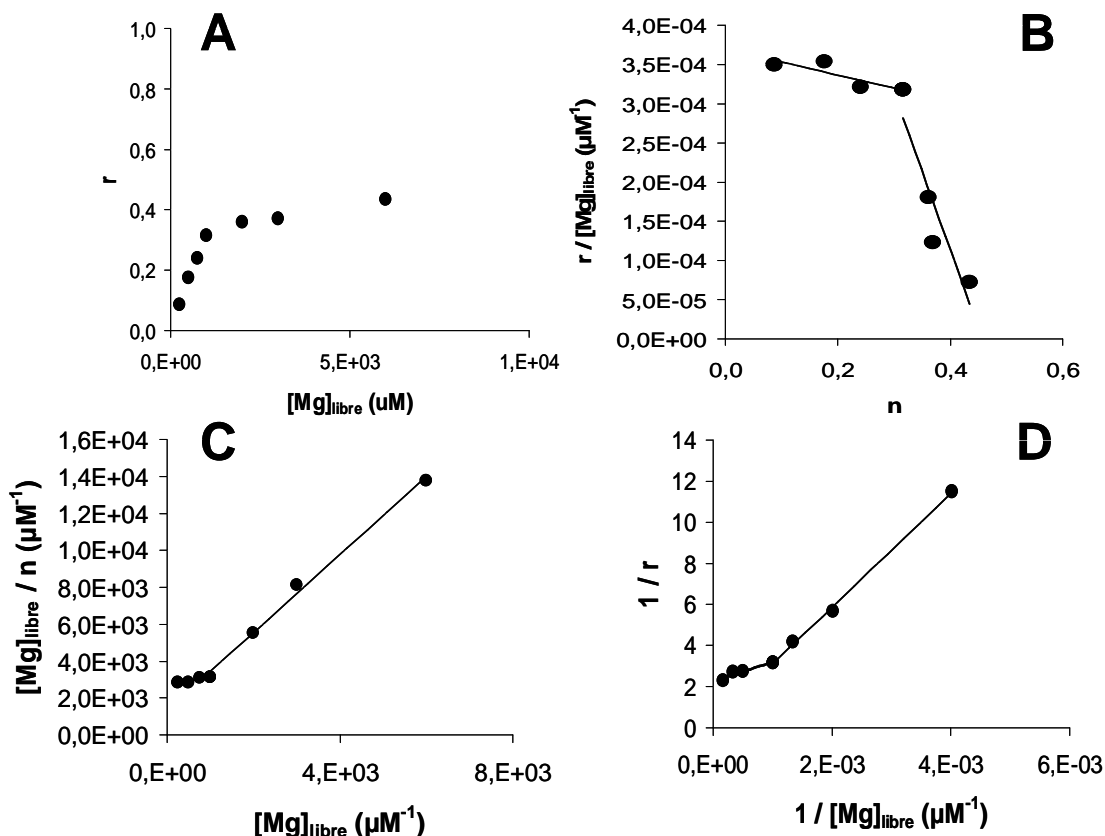


Figure 8 : représentation des données expérimentales obtenues pour la détermination de l'interaction aptamère – magnésium par analyse frontale sous les formes de l'isotherme (A), x-réciproque (B), y-réciproque (C) et double réciproque (D). Conditions : cf. Figure 8.

Dans la gamme de concentration en magnésium étudiée, la représentation de Scatchard ($R^2 = 0,7557$) se compose de deux segments de droites (Figure 8B). Ce phénomène se retrouve, dans une moindre mesure, sur les représentations y-réciproque et double-réciproque. La détermination des paramètres des deux segments de droite conduit aux valeurs (Tableau 4):

$$\begin{aligned} kd_1 &= 6,2 \pm 1,4 \text{ mM} & n_1 &= 2,33 \pm 0,42 \quad (0,25 < [MgCl_2] < 1 \text{ mM}) \\ kd_2 &= 0,5 \pm 0,1 \text{ mM} & n_2 &= 0,45 \pm 0,02 \quad (1 < [MgCl_2] < 6 \text{ mM}) \end{aligned}$$

Ces résultats traduisent une tendance du magnésium à se lier à l'aptamère par l'intermédiaire de deux classes de sites d'affinités différentes, via un mécanisme coopératif ($k_{d1} > k_{d2}$). La proportion relative de chacun des sites peut être déterminée en calculant la contribution relative de leur k_d au k_d global. Il résulte ainsi qu'il existe environ 10% de sites de faible affinité, actif à faible concentration en aptamère (< 1 mM) et environ 90% de sites de haute affinité, actif à concentration en aptamère plus élevée (> 1 mM). L'existence de ces deux classes de sites n'avait pas été observée en ACE dans l'électrolyte MOPS/NaOH.

Tableau 4 : détermination des paramètres de l'interaction aptamère – magnésium par les méthodes de linéarisation et le calcul direct. Conditions : cf. Figure 8.

	Equation des droites	K_d (mM)	n (Mg/Apt)	% de sites
Calcul direct	-	$3,4 \pm 1,4$	0,94	-
Linéarisation Mg 0,25 – 6 mM	x-réc : $y = -0,0008x + 0,0005$ ($R^2 = 0,7557$) y-réc : $y = 2,0077x + 1763,2$ ($R^2 = 0,9908$) d-réc : $y = 2381,9x + 1,4218$ ($R^2 = 0,974$)	$1,3 \pm 0,4$	$0,61 \pm 0,10$	-
Linéarisation Mg 0,25 – 1 mM	x-réc : $y = -0,0002x + 0,0004$ ($R^2 = 0,7386$) y-réc : $y = 0,4588x + 2699,5$ ($R^2 = 0,7959$) d-réc : $y = 2754,9x + 0,3564$ ($R^2 = 0,9985$)	$6,2 \pm 1,4$	$2,33 \pm 0,42$	8,5
Linéarisation Mg 1 – 6 mM	x-réc : $y = -0,002x + 0,0009$ ($R^2 = 0,8525$) y-réc : $y = 2,1124x + 1321,5$ ($R^2 = 0,9948$) d-réc : $y = 925,81x + 2,2723$ ($R^2 = 0,9065$)	$0,5 \pm 0,1$	$0,45 \pm 0,02$	91,5

Annexe 3

Etude de l'interaction aptamère – thrombine par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE)

Avant d'aborder l'interaction entre le lysozyme et son aptamère, nous nous sommes intéressés à l'étude d'un système modèle, dont l'analyse en électrophorèse capillaire est particulièrement bien décrite dans la littérature : il s'agit du couple aptamère-thrombine. Un aptamère anti-thrombine marqué par un fluorophore a notamment été employé en CE-LIF pour l'analyse quantitative de la thrombine par NECEEM [1-3] ou pour l'étude de l'interaction thrombine-protéine [4]. L'affinité de l'aptamère pour la thrombine est relativement faible : des constantes de dissociation (K_d) de 240 ± 16 nM [1] et ~ 450 nM [3] ont été déterminées, alors que la plupart des aptamères dirigés contre des cibles protéiques présentent des K_d de l'ordre de 10^{-9} M.

Les conditions opératoires seront choisies de façon à ce que l'aptamère et la thrombine soient tous deux chargés négativement (tampon borate pH 9,2), afin de limiter les problèmes d'adsorption et d'éviter les interactions électrostatiques non spécifiques. Deux configurations seront employées et comparées, et l'effet de la force ionique du milieu sur l'affinité du complexe formé sera discuté.

1. Description et propriétés de la thrombine

La thrombine est une glycoprotéine globulaire ($M_m = 37\,423$ Da) composée de deux chaînes [5, 6] : une chaîne légère (appelée chaîne A) constituée de 36 acides aminés ($M = 5\,614$ Da), et une chaîne lourde (appelée chaîne B) constituée de 259 acides aminés ($M = 31\,819$ Da) comportant une portion peptide ($M_m = 29\,485$ Da) et une portion carbohydate ($M = 2\,334$ Da). Il est probable que la chaîne A régule la spécificité de la chaîne B, chaîne catalytique dite « trypsin-like » [7].

La thrombine est une protéase (enzyme clivant les liaisons peptidiques) issue du clivage enzymatique de la prothrombine par le facteur de coagulation, également appelé facteur X. Son rôle principal est la transformation du fibrinogène en fibrine (protéine

insoluble à l'origine de la formation du caillot sanguin) par clivage de la liaison arginine-glycine [8], dernière étape de la cascade de la coagulation plasmatique.

La thrombine existe sous plusieurs formes, la forme active (α -thrombine) pouvant conduire par dégradation à des formes inactives (β -thrombine et γ -thrombine) [9]. L'activité enzymatique de la thrombine dépend ainsi fortement du pH, de la température et de la présence de composés délétères [10]. En milieu acide, la thrombine est inactivée de façon réversible entre pH 3,5 et pH 4,1, et de façon irréversible en dessous de pH 3,5. En milieu basique, l'inactivation débute à pH 10 et devient très marquée au-delà de pH 11. En solution aqueuse, un chauffage à 40°C pendant 30 minutes conduit à une inactivation partielle ; à 60°C, l'inactivation est quasi-totale. Enfin, la présence d'acide nitrique entraîne l'inactivation de la thrombine.

La thrombine existe sous plusieurs isoformes de points isoélectriques (pI) compris entre 6,30 et 7,55. L'isoforme majoritaire a un pI de 7,31. Elle est soluble dans l'eau à environ 3 mg/mL, mais la solubilité peut augmenter jusqu'à 10 mg/mL dans les solutions de force ionique élevée (environ 3 M). Conservées entre 0 et 5°C, les solutions aqueuses de thrombine sont stables pendant une semaine [8].

2. Caractérisation des constituants du système par électrophorèse de zone

Dans un premier temps, nous avons caractérisé le comportement électrophorétique des constituants du système d'interaction (thrombine et aptamère anti-thrombine) afin de faciliter le développement ultérieur de la méthode de détermination de la constante d'interaction.

2.1. Caractérisation de la thrombine

La thrombine utilisée est issue de plasma humain, puis lyophilisée. Deux lots différents ont été testés : le lot n°1 (Sigma, réf. T7009) et le lot n°2 (Biochemika, réf. 89223), qui ne contient que 4% en masse de protéine (les 96% restant consistent majoritairement en des sels de lyophilisat : chlorure et citrate de sodium).

Afin d'éviter la précipitation de la thrombine et de limiter son adsorption sur la paroi interne du capillaire en silice vierge, la caractérisation de la thrombine a été réalisée à un pH supérieur à son pI, de façon à ce qu'elle soit chargée négativement. Différents électrolytes

(gamme pH 7 – 10) ont été testés : phosphate de sodium (pH 7,2), Tris-HCl (pH 8,1), borate de sodium (pH 9,5) et formiate d'ammonium (pH 10,0), sur une gamme de force ionique allant de 20 à 50 mM. Le profil électrophorétique le plus satisfaisant en termes d'allure des pics (symétrie, finesse) et de stabilité de la ligne de base a été observé dans l'électrolyte borate de sodium 20 mM (pH 9,5). L'électrophérogramme obtenu (Figure 9) présente deux pics : (i) un pic légèrement asymétrique, de mobilité électrophorétique voisine de $-35.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$ (Thr1), et (ii) un pic fortement asymétrique, de mobilité électrophorétique voisine de $-50.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$ (Thr2). La symétrie respective des pics peut s'expliquer par la mobilité du co-ion borate ($-28.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$), proche de celle du pic Thr1 et très différente de celle du pic Thr2. Les deux pics observés présentent une faible absorption à 280 nm (longueur d'onde caractéristique des protéines, du fait de la présence d'acides aminés aromatiques) ce qui confirme leur nature protéique. La présence de ces deux pics pourrait éventuellement s'expliquer par l'existence de deux formes différentes de la thrombine (monomère et dimère ?), bien qu'à notre connaissance ce phénomène n'ait pas été reporté dans la littérature. Afin d'obtenir des résultats cohérents et répétables, il est nécessaire d'homogénéiser régulièrement la solution de thrombine en procédant à l'agitation de l'échantillon (vortex).

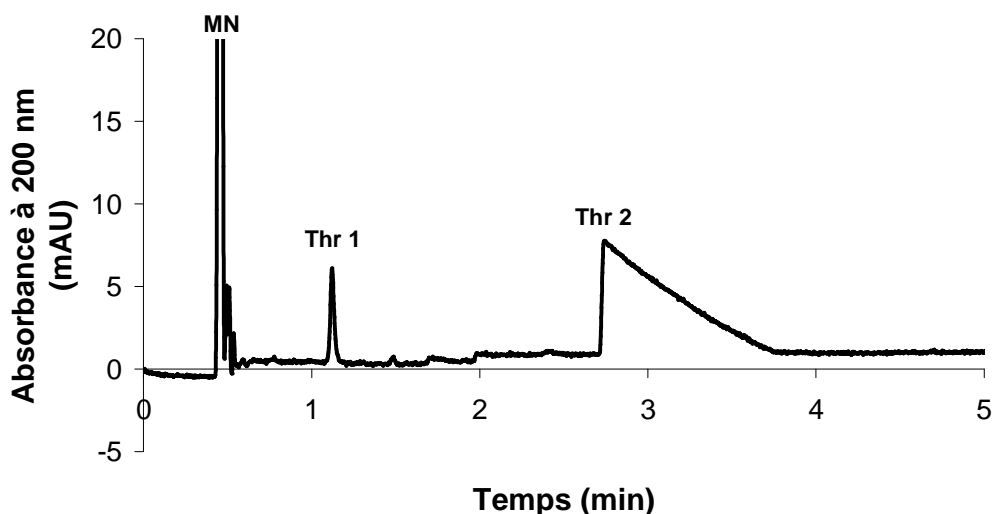


Figure 9 : profil électrophorétique de la thrombine (Thr). Capillaire en silice vierge : 50 μm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Electrolyte de séparation : borate de sodium 20 mM (pH 9,5). Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Echantillon (Thr) : solution aqueuse de thrombine (lot n°1) à 0,20 mg/mL. Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +15 kV. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm.

Les profils observés pour chacun des lots (électrolyte borate de sodium 20 mM (pH 9,5)) sont similaires. Les mobilités électrophorétiques obtenues pour chaque lot sont reportées dans le Tableau 5. Sauf précision contraire, la thrombine utilisée ultérieurement sera issue du lot n°1. La différence de mobilité électrophorétique mesurée pour le pic Thr2 provient très

probablement de la forme étalée du pic qui induit une détermination peu précise de la mobilité électrophorétique. Le rapport des aires corrigées de Thr2/Thr1 selon les deux longueurs d'onde semble indiquer un caractère « plus protéique » pour la Thr1.

Tableau 5 : mobilité de la thrombine (pics Thr1 et Thr2) et rapport des aires corrigées (pic Thr2 / pic Thr1) à 200 et 280 nm pour les 2 lots testés. Conditions : cf. Figure 9.

Echantillon	m_{eo} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	$m_{ep \text{ Thr1}}$ ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	$m_{ep \text{ Thr2}}$ ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Rapport des aires corrigées des pics Thr2/Thr1 (200 nm)	Rapport des aires corrigées des pics Thr2/Thr1 (280 nm)
Lot n°1 (n = 4)	$59,5 \pm 0,4$	$-34,6 \pm 0,3$	$-52,5 \pm 0,3$	$5,7 \pm 1,1$	$1,6 \pm 1,0$
Lot n°2 (n = 3)	$67,7 \pm 0,4$	$-35,4 \pm 0,3$	$-58,1 \pm 0,1$	$4,8 \pm 1,3$	$1,5 \pm 0,9$

L'analyse de la thrombine a également été effectuée à pH inférieur au pI, dans un électrolyte acétate de sodium 30 mM (pH 5,0). Afin de limiter l'adsorption de la thrombine chargée positivement sur la paroi interne du capillaire, une modification dynamique par le PEO a été réalisée [11, 12]. L'injection de la thrombine dans ces conditions conduit à un unique pic de mobilité électrophorétique quasi-nulle ($m_{ep} = -0,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), dissymétrique du fait de la différence de mobilité avec le co-ion de l'électrolyte mais ne présentant pas de traînée d'adsorption. Ces résultats corroborent ce qui avait déjà été observé lors de l'analyse du lysozyme en capillaire modifié PEO (cf. Chapitre II), suggérant l'existence d'interactions entre les protéines et le PEO.

2.2. Caractérisation de l'aptamère anti-thrombine

L'aptamère anti-thrombine est un oligonucléotide ADN de 15 bases dont voici la séquence : 5'-GGT TGG TGT GGT TGG-3', fournit par Eurogentec France (Angers, France). Riche en guanine, cet aptamère est notamment connu pour former une structure quadruple intramoléculaire (Figure 10) constituée de deux G-quartets et de trois boucles latérales [13]. Celle-ci peut être stabilisée par intercalation d'un cation monovalent (K^+ [14-16], Rb^+ ou NH_4^+ [16]) ou divalent (Ba^{2+} [14, 16] ou Sr^{2+} [14, 16]), favorisant ainsi l'interaction de l'aptamère avec la thrombine. Cependant, certaines études ont montré que l'interaction pouvait avoir lieu même en l'absence de cation stabilisant, la formation du quadruple étant alors induite par la complexation avec la thrombine [17, 18].

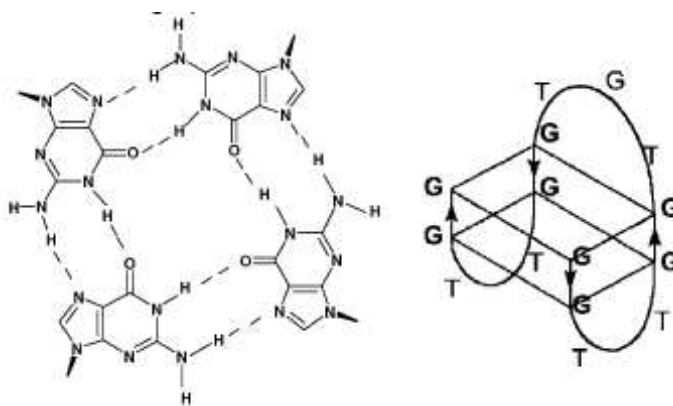


Figure 10 : structure G-quadruplexe (à gauche) et représentation schématique (à droite) du G-quadruplexe intramoléculaire de l'aptamère anti-thrombine [14]

L'aptamère anti-thrombine a donc été caractérisé par électrophorèse de zone, dans le même électrolyte que celui employé pour l'analyse de la thrombine (borate de sodium 20 mM (pH 9,5)). Afin de promouvoir la formation du quadruplexe, un cation divalent (Mg^{2+}) a été ajouté dans l'échantillon d'aptamère, et celui-ci a été soumis à une activation thermique : chauffage pendant 10 minutes au bain-marie à 75°C, puis refroidissement à température ambiante pendant au moins 30 minutes. Le profil obtenu est présenté Figure 11. L'aptamère apparaît sous forme d'un pic de mobilité électrophorétique $-35.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$, légèrement dissymétrique du fait de la différence de mobilité avec le co-ion borate ($m_{ep} = -28.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$). L'absorption UV à 254 et 280 nm est caractéristique des acides nucléiques.

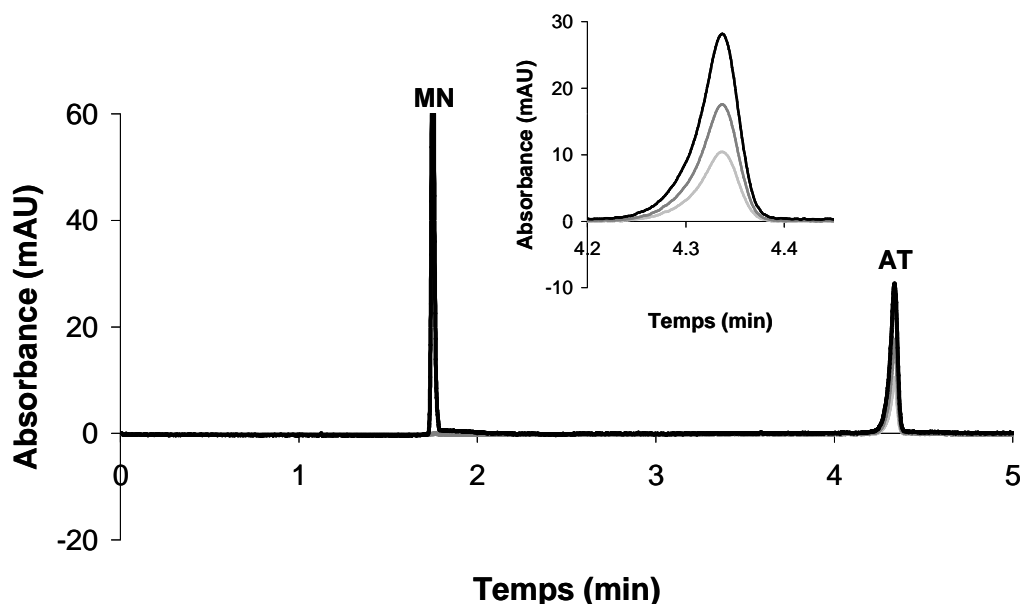


Figure 11 : profil électrophorétique de l'aptamère anti-lysozyme (AT). Capillaire en silice vierge : 50 μm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Electrolyte de séparation : borate de sodium 20 mM (pH 9,5). Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Echantillon (AT) : aptamère anti-thrombine 50 μM dans l'électrolyte + $MgCl_2$ 10 mM. Activation thermique : bain-marie 75°C (10 min), refroidissement à T_{amb} (< 30 min). Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +15 kV. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm (noir), 254 nm (gris foncé) et 280 nm (gris clair).

Afin d'évaluer la stabilité temporelle de l'aptamère anti-thrombine, celui-ci a été incubé dans des milieux de pH différents : (i) eau, (ii) formiate d'ammonium 10 mM (pH 9,8) et (iii) formiate d'ammonium 10 mM (pH 10,3). Les différents échantillons ont été analysés dans un électrolyte formiate d'ammonium 10 mM (pH 10,3) à différents temps d'incubation. L'évolution de la mobilité électrophorétique ne montre pas de différence notable entre les différents échantillons. L'incubation de l'aptamère pendant 24h dans les différents milieux testés n'entraîne aucune évolution notable de la mobilité et des profils électrophorétiques, ce qui démontre la stabilité temporelle de l'aptamère, même à pH basique.

2.3. Injection directe du mélange aptamère – thrombine

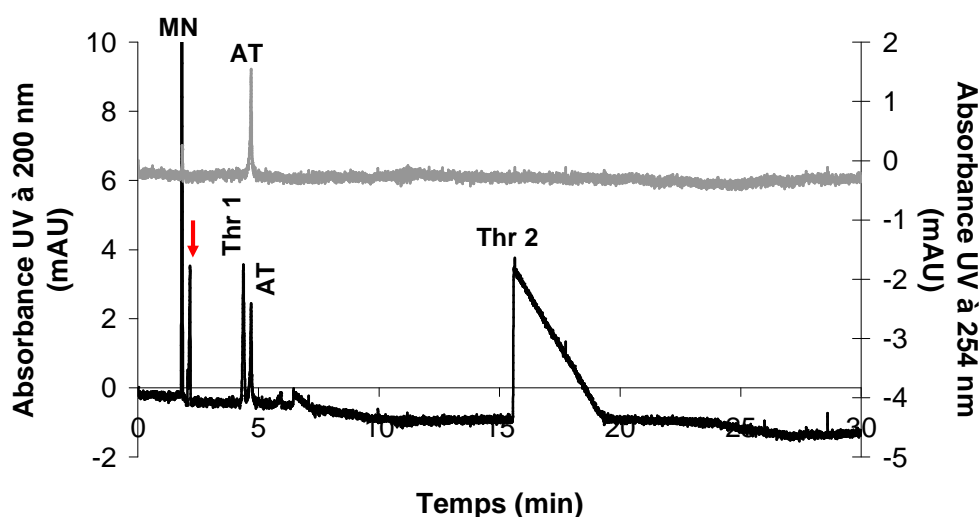


Figure 12 : profil électrophorétique obtenu lors de l'analyse par CZE du mélange incubé aptamère-thrombine. Capillaire en silice vierge : 50 μm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Electrolyte de séparation : borate de sodium 20 m (pH 9,5). Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Echantillon : mélange aptamère anti-thrombine activé (AT) 5 μM + thrombine 5 μM incubé dans l'électrolyte + MgCl_2 10 mM. Activation thermique de l'aptamère : bain-marie 75°C (10 min), refroidissement à T_{amb} (< 30 min). Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +15 kV. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm (noir) et 254 nm (gris).

Afin d'obtenir une première estimation de la stabilité du complexe aptamère-thrombine, nous avons tout d'abord procédé à l'injection directe d'un mélange pré-incubé, suivie d'une séparation des constituants par électrophorèse capillaire de zone dans des conditions identiques à celles employées lors de la caractérisation individuelle des partenaires. Le profil électrophorétique obtenu (Figure 12) présente 4 pics caractéristiques, outre le marqueur neutre (Tableau 6) :

- un pic de mobilité électrophorétique $-35,3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, absorbant à 200 et 254 nm, correspondant à l'aptamère anti-thrombine libre (AT) ;

- deux pics de mobilités électrophorétiques $-33,6 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $-50,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, absorbant à 280 nm mais pas à 254 nm, correspondant à la thrombine (Thr 1 et Thr 2) ;
- un pic de mobilité électrophorétique $-9,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, n'absorbant ni à 254 nm ni à 280 nm.

Tableau 6 : attribution des pics de l'électrophérogramme obtenu lors de l'analyse par CZE du mélange incubé aptamère-thrombine (cf. Figure 12).

$m_{\text{app}} (10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$m_{\text{ep}} (10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	Attribution
57,2	-	Marqueur neutre (MN)
47,3	-9,9	?
23,5	-33,6	Thrombine 1 (Thr 1)
21,9	-35,3	Aptamère (AT)
6,7	-50,5	Thrombine 2 (Thr 2)

Ce dernier pic pourrait correspondre au complexe, mais la finesse de l'ensemble des pics ainsi que l'absence de variation notable de l'aire et de la hauteur des pics correspondant à l'aptamère et à la thrombine entre l'injection individuelle des composés et l'injection du mélange suggèrent plutôt une dissociation totale du complexe lors de la migration électrophorétique, le pic observé résultant probablement de la présence d'une impureté. L'injection directe du mélange incubé aptamère - thrombine ne permet donc pas d'étudier l'interaction.

3. Détermination des paramètres de l'interaction aptamère – thrombine par électrophorèse capillaire d'affinité

L'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) consiste à effectuer la migration électrophorétique d'un des partenaires de l'interaction (substrat) dans un électrolyte contenant une concentration variable de l'autre partenaire (ligand). L'évolution de la mobilité électrophorétique du substrat en fonction de la concentration en ligand conduit à une isotherme d'adsorption, qui permet la détermination de la constante d'affinité via des méthodes de linéarisation mathématique. Pour le système aptamère-thrombine, deux configurations sont envisageables :

- (i) injection de la thrombine dans un électrolyte contenant une concentration croissante d'aptamère. La thrombine joue alors le rôle de substrat, et l'aptamère celui de ligand.

- (ii) injection de l'aptamère dans un électrolyte contenant une concentration croissante de thrombine. L'aptamère joue alors le rôle de substrat, et la thrombine celui de ligand.

3.1. Injection de la thrombine (lot n°1)

3.1.1. Influence de la concentration en magnésium sur le profil de la thrombine

La présence d'un cation divalent est souvent préconisée afin de favoriser la formation de la structure quadruple de l'aptamère, et donc son interaction avec la thrombine. La configuration envisagée implique donc d'injecter la thrombine dans un électrolyte contenant à la fois l'aptamère et le magnésium. Or la présence d'un cation divalent dans l'électrolyte modifie sa force ionique, et donc la mobilité de la thrombine. Nous avons donc dans un premier temps étudié l'influence sur le comportement électrophorétique de la thrombine de l'ajout de magnésium dans l'électrolyte de séparation, afin de déterminer la concentration permettant une analyse optimale.

Pour cela, la thrombine a été injectée puis séparée par CZE dans un tampon borate 20 mM (pH 9,5) contenant une concentration croissante de magnésium (0 – 6 mM). L'évolution de la mobilité électroosmotique et de la mobilité électrophorétique des deux pics de la thrombine est présentée Figure 13. L'attribution des pics 1 et 2 est effectuée par comparaison des aires corrigées obtenues. A partir d'une concentration en magnésium de 1,5 mM, on observe une inversion des pics Thr1 et Thr2 de la thrombine, la mobilité électrophorétique du pic Thr2 devenant inférieure (en valeur absolue) à celle du pic 1. L'influence de la concentration en magnésium n'est ainsi pas la même pour les deux pics de la thrombine : la mobilité électrophorétique du pic Thr1 ne dépend quasiment pas de la concentration en magnésium dans l'électrolyte, alors que la mobilité électrophorétique du pic Thr2 diminue fortement (en valeur absolue) lorsque la teneur en magnésium augmente. Cette évolution est due à l'augmentation de force ionique induite par l'ajout de magnésium, qui se traduit aussi par une diminution du flux électroosmotique du fait de la diminution de l'épaisseur de la double-couche électrique.

Pour $[MgCl_2] > 1,5$ mM, la mobilité électrophorétique du pic Thr1 devient supérieure (en valeur absolue) à la mobilité électroosmotique ; il n'est donc pas visualisé en polarité positive. A partir d'une concentration en magnésium supérieure à 4 mM, la mobilité

électroosmotique est inférieure aux mobilités électrophorétiques des deux pics de la thrombine, qui doivent donc être tous deux visualisés en polarité négative.

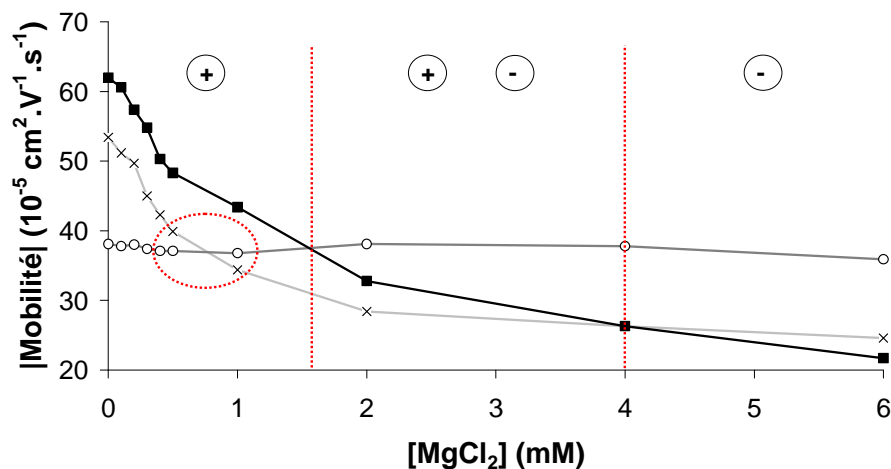


Figure 13 : influence de la concentration en magnésium dans l'électrolyte de séparation sur la mobilité électroosmotique (■) et sur la mobilité électrophorétique de la thrombine (pics Thr1 (○) et Thr2 (x)). Capillaire en silice vierge : 50 μm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Electrolyte de séparation : borate de sodium 20 mM (pH 9,5) + MgCl_2 (0 – 6 mM). Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Echantillon : thrombine 5 μM dans le borate de sodium 20 mM (pH 9,5). Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : ± 15 kV. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm.

En électrophorèse d'affinité, il sera donc nécessaire de maintenir constante la concentration en magnésium de l'électrolyte, afin de ne pas introduire de facteur supplémentaire dans l'évolution de la mobilité de la thrombine. Le choix de la concentration en magnésium doit notamment répondre aux contraintes suivantes :

- (i) visualisation des deux pics en polarité positive : $[\text{MgCl}_2] < 1,5$ mM
- (ii) temps de migration suffisamment courts pour garantir une bonne définition des pics et donc une détermination correcte des mobilités : $[\text{MgCl}_2] \leq 0,5$ mM
- (iii) résolution suffisante des pics 1 et 2 : $[\text{MgCl}_2] \leq 0,3$ mM
- (iv) symétrie de pic proche de celle obtenue en l'absence de MgCl_2 : $[\text{MgCl}_2] < 0,2$ mM

Au vu de ces différentes considérations, nous avons opté pour une concentration en magnésium de 0,1 mM. Il est à noter que cette concentration est d'un à deux ordres de grandeur plus faible que celle habituellement employée lors de la mise en œuvre de l'interaction aptamère – thrombine (1 – 10 mM).

3.1.2. Mise en œuvre de l'électrophorèse capillaire d'affinité

Des électrolytes borate de sodium 20 mM (pH 9,5) contenant une concentration croissante d'aptamère (0,05 – 100 μ M) ainsi que 0,1 mM de magnésium sont préparés par dilutions successives, à partir d'une solution-mère d'aptamère 100 μ M réalisée dans un tampon borate de sodium 20 mM (pH 9,5) contenant 2 mM de magnésium, puis activée thermiquement. La migration électrophorétique de la thrombine (5 μ M dans l'électrolyte borate de sodium 20 mM pH 9,5) est réalisée dans un capillaire en silice vierge, dans les différents électrolytes préparés. Trois injections successives sont réalisées pour chaque concentration en aptamère. L'échantillon de thrombine est homogénéisé au vortex entre chaque série de mesures. La Figure 14 présente l'allure des profils électrophorétiques obtenus selon la concentration en aptamère de l'électrolyte. Une légère diminution des temps de migration, visible surtout pour le pic Thr2 de la thrombine (Thr 2) est observée parallèlement à l'augmentation de la concentration en aptamère, traduisant la diminution de la mobilité électrophorétique. Pour les concentrations en aptamère les plus élevées (10 – 100 μ M), le pic Thr1 de la thrombine devient négatif, probablement en partie du fait de l'absorbance de l'aptamère présent dans l'électrolyte.

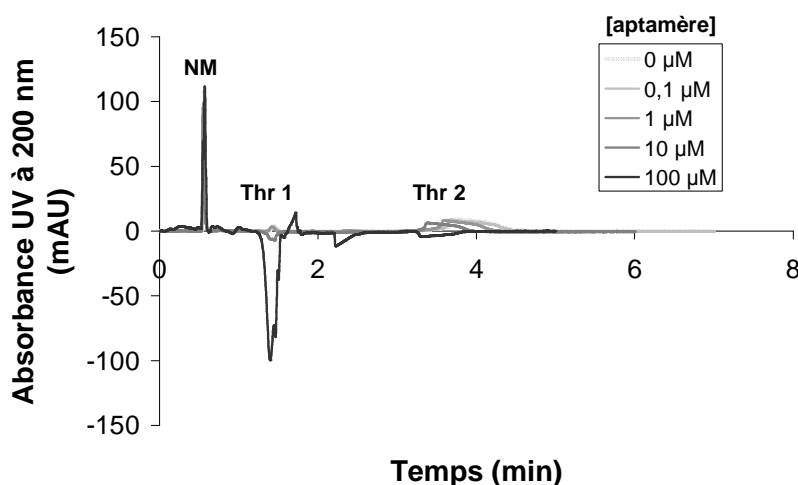


Figure 14 : évolution du profil électrophorétique de la thrombine lors de l'ajout de l'aptamère dans l'électrolyte de séparation. Capillaire en silice vierge : 50 μ m de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Electrolyte de séparation : borate de sodium 20 mM (pH 9,5) + aptamère anti-thrombine 0,05 – 100 μ M + $MgCl_2$ 0,1 mM. Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Echantillon : thrombine 5 μ M dans le borate de sodium 20 mM (pH 9,5). Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +15 kV. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm.

3.1.3. Correction de la mobilité électrophorétique

La variation de mobilité de la thrombine observée lors de l'ajout d'aptamère dans l'électrolyte de séparation peut être causée, outre par la complexation avec l'aptamère, par

d'autres phénomènes tels que l'augmentation de viscosité et de force ionique qu'entraîne l'ajout de l'aptamère. Avant de pouvoir exploiter les résultats obtenus, plusieurs corrections doivent donc être apportées aux mobilités électrophorétiques mesurées :

- (i) correction de viscosité
- (ii) correction des longueurs de migration
- (iii) correction de force ionique

3.1.3.1. Correction de viscosité

La mobilité électrophorétique d'un composé ionique dépend de la viscosité de l'électrolyte de séparation, suivant le modèle de Stokes (l'ion étant considéré comme une sphère dure imperméable au solvant) (Equation 1) :

$$m^{\infty} = \frac{z e}{6 \pi \eta R} \quad (1)$$

m^{∞} est la mobilité du composé à dilution infinie, z son nombre de charge, e la charge de l'électron, η la viscosité du solvant et R le rayon hydrodynamique du composé (également appelé rayon de Stokes).

Lors des expériences d'ACE, l'ajout d'un des partenaires dans l'électrolyte de séparation est susceptible d'entraîner une augmentation de la viscosité de ce dernier, et donc une diminution de la mobilité du composé injecté. Afin de s'assurer que l'évolution de mobilité du substrat est due à la complexation avec le ligand, et non aux variations de viscosité, il est nécessaire de corriger la mobilité électrophorétique du substrat (Equation 2) :

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

m_{ep}^{corr} et m_{ep} sont la mobilité électrophorétique respectivement corrigée et non corrigée, η la viscosité de l'électrolyte considéré et η_0 la viscosité de référence (ici celle de l'électrolyte sans ligand).

Les mesures de viscosité par électrophorèse capillaire consistent à remplir le capillaire avec l'électrolyte de séparation, à injecter une courte zone de marqueur neutre, puis à percoler sous une pression P_0 avec l'électrolyte. Le temps de sortie du marqueur neutre permet alors de déterminer la viscosité η de l'électrolyte selon la loi de Hagen-Poiseuille (Equation 3) [19] :

$$\eta = \frac{d_c^2 P_0 t_0}{32 L l} \quad (3)$$

d_c est le diamètre interne du capillaire (m), P_0 la pression de percolation (Pa), t_0 le temps de sortie du marqueur neutre, L et l les longueurs totale et effective du capillaire. Pour une meilleure exactitude des mesures, le produit $d_c^2 P_0$ peut être calibré à l'aide d'une solution de viscosité connue, comme l'éthylène glycol ($\eta = 16.1 \times 10^{-3}$ Pa.s à 25°C) ou le diéthylène glycol ($\eta = 29.0 \times 10^{-3}$ Pa.s à 25°C).

La viscosité de chacun des électrolytes employés en ACE a donc été déterminée via cette procédure. Trois mesures ont été réalisées pour chaque concentration en aptamère. La Figure 15 présente les résultats obtenus, qui seront utilisés lors de la correction des données expérimentales obtenues en ACE. Il a été noté que le volume de solution dans le vial avait une influence notable sur la valeur de la viscosité mesurée : il est donc important de réaliser les différentes mesures sur des volumes de solution identiques (500 μ L). De façon étonnante, la viscosité de l'électrolyte augmente d'abord rapidement avec la concentration en aptamère ajouté, puis semble atteindre un palier pour les concentrations supérieures à 20 μ M.

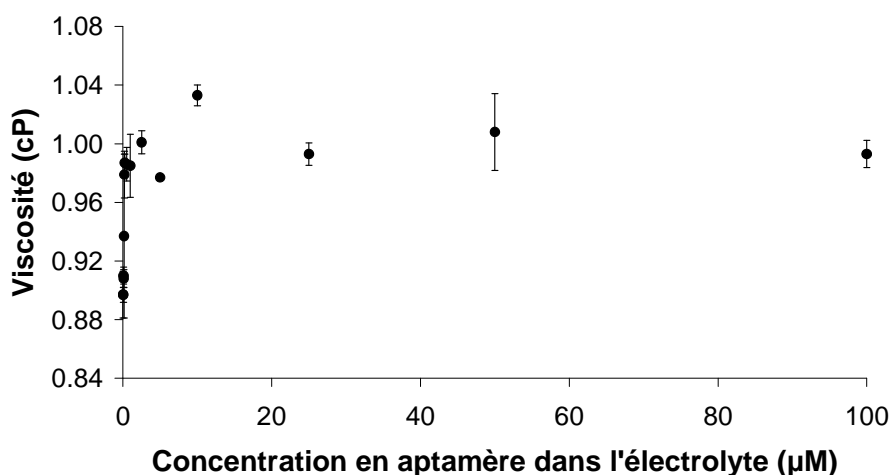


Figure 15 : viscosité de l'électrolyte borate de sodium 20 mM (pH 9,5) en fonction de la concentration en aptamère anti-thrombine. Capillaire en silice vierge : 50 μ m de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Electrolyte : borate de sodium 20 mM (pH 9,5) + aptamère anti-thrombine 0,05 – 100 μ M + $MgCl_2$ 0,1 mM. Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Percolation : 30 mbars. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm.

3.1.3.2. Correction des longueurs de migration

Une correction de la longueur de migration est également effectuée pour le marqueur neutre (Equation 4) et pour l'échantillon (Equation 5) [20] :

$$l_{NM}^{corr} = l - (l_2 + l_3 + l_4) - 0,5 l_1 \quad (4)$$

$$l_{éch}^{corr} = l - l_4 - 0,5 l_3 \quad (5)$$

l_i est la longueur de zone correspondant à chaque injection, calculée d'après la loi de Hagen-Poiseuille (Equation 6) :

$$l_i = \frac{d_c^2 P_{inj} t_{inj}}{32 \eta L} \quad (6)$$

d_c est le diamètre du capillaire (m), P_{inj} la pression d'injection (Pa), t_{inj} le temps d'injection, η la viscosité de l'électrolyte et L la longueur totale du capillaire. Les longueurs de migration corrigées doivent donc également tenir compte de la viscosité de l'électrolyte mesurée, et différeront ainsi en fonction de la concentration en aptamère dans l'électrolyte.

3.1.3.3. Correction de force ionique

Aucune variation notable du courant électrique n'a été observée lors de l'augmentation de la concentration en aptamère ($\Delta I \sim 1 \mu A$, soit une variation de 4% lors de l'ajout de 100 μM d'aptamère dans l'électrolyte), ce qui reflète une force ionique quasi-constante de l'électrolyte de séparation. Ceci est cohérent avec le fait que la concentration en aptamère (0,05 – 100 μM) reste faible par rapport à celle des constituants de l'électrolyte (acide borique : 9,34 mM ; borate de sodium : 20 mM). Il n'est donc pas utile de corriger les mobilités électrophorétiques de ce facteur.

3.1.4. Exploitation des résultats

Après correction des longueurs de migration et de la viscosité, la mobilité électrophorétique de chacun des pics de la thrombine a été tracée en fonction de la concentration en aptamère dans l'électrolyte. L'isotherme d'adsorption obtenue (Figure 16) montre une augmentation de la mobilité électrophorétique de la thrombine (en valeur absolue) lorsque la concentration en aptamère dans l'électrolyte augmente. Cette constatation est en accord avec l'évolution attendue : en effet, la complexation de la thrombine, molécule de grande taille ($M = 37\,423 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) et chargée négativement, avec l'aptamère, polyanion de taille plus restreinte ($M = 4\,726,13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), est susceptible de conduire à une faible augmentation de taille couplée à une augmentation plus importante de la charge, aboutissant ainsi à une augmentation de la mobilité électrophorétique (proportionnelle au rapport charge/taille). Rappelons qu'une éventuelle augmentation de la force ionique due à la présence de l'aptamère dans l'électrolyte de séparation conduirait au phénomène inverse (diminution de la mobilité électrophorétique). L'isotherme est ensuite linéarisée suivant plusieurs méthodes mathématiques (cf. Annexe 5).

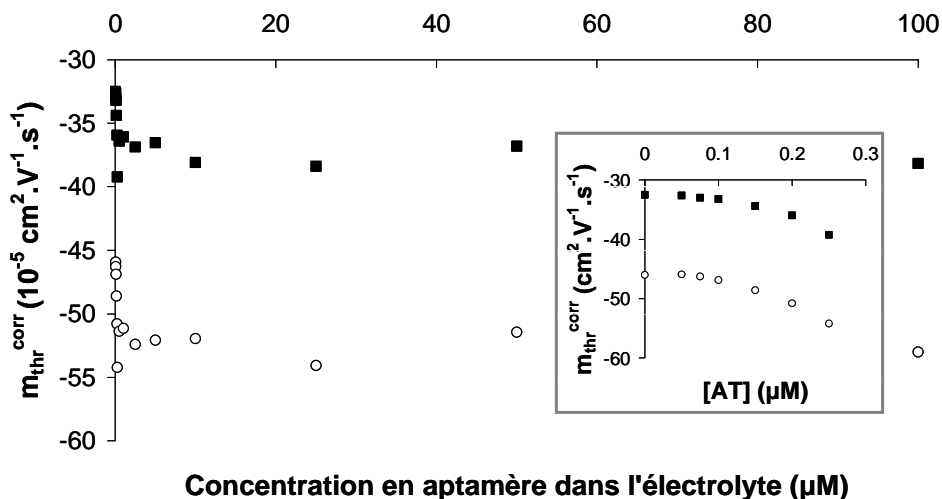


Figure 16 : isotherme d'adsorption de la thrombine : mobilité électrophorétique corrigée des pics 1 (■) et 2 (○) de la thrombine en fonction de la concentration en aptamère dans l'électrolyte. Conditions : cf. Figure 14.

La représentation de Scatchard (Figure 17A), issue de la linéarisation de l'isotherme par la méthode x-réciproque, fait apparaître une droite pour les concentrations en aptamère inférieures ou égales à 0,25 μM .

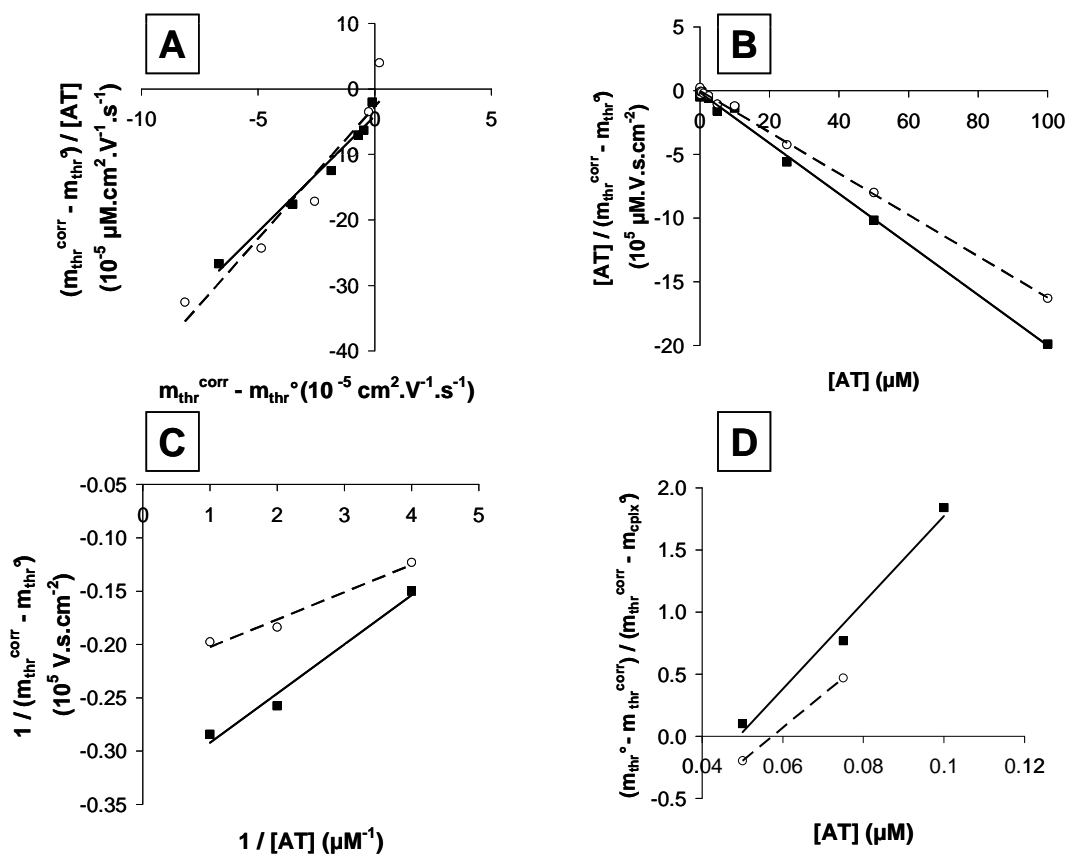


Figure 17 : linéarisation de l'isotherme d'adsorption de la thrombine par la méthode x-réciproque (A), y-réciproque (B), double-réciproque (C) et isotherme (D) pour les pics 1 (■) et 2 (○) de la thrombine. Conditions : cf. Figure 14.

Au-delà de cette valeur, les points semblent suivre une répartition aléatoire, sans doute du fait de l'éloignement entre la gamme de concentration et la constante de dissociation ou d'une trop faible concentration en magnésium (100 μM). La linéarisation des données expérimentales sera donc effectuée pour une gamme de concentration en aptamère allant de 0,05 à 0,25 μM .

Les représentations graphiques obtenues via les différentes méthodes de linéarisation sont présentées Figure 17. Les équations des droites correspondantes, ainsi que les constantes de dissociation (K_d) et les mobilités du complexe (m_{cplx}^0) qui en découlent figurent dans le Tableau 7. Les valeurs de K_d obtenues pour les deux pics de la thrombine (respectivement 279 ± 280 et 110 ± 98 nM) sont du même ordre que celles reportées dans la littérature (240 ± 16 nM [1] et ~ 450 nM [3]). Elles présentent cependant une très forte dispersion, due à l'hétérogénéité des valeurs obtenues pour les différentes méthodes. Compte tenu de cette dispersion, les affinités des deux pics peuvent être considérées comme équivalentes. Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle les deux pics observés correspondraient à des formes différentes de la thrombine. La détermination de la constante d'interaction étant trop imprécise pour conclure, la deuxième configuration envisagée a donc été mise en œuvre.

Tableau 7 : équation des droites ($y = ax + b$), constante de dissociation (K_d) et mobilité électrophorétique du complexe (m_{cplx}^0) obtenues par les différentes méthodes de linéarisation pour les deux pics de la thrombine.

Pic	Méthodes	a	b	R ²	K _d (nM)	m _{cplx} ⁰ (10 ⁻⁵ cm ² .V ⁻¹ .s ⁻¹)
1	x-réc	3,5331	-4,1541	0,9713	283	-33,7
	y-réc	-0,1987	-0,1328	0,9970	668	-37,5
	double-réc	0,0461	-0,3381	0,9794	136	-29,5
	isotherme	34,794	-1,7056	0,9822	29	
	Moyenne				279 ± 280	-33,6 ± 4,0
2	x-réc	4,0347	-2,6993	0,9192	248	-46,7
	y-réc	-0,1622	-0,0069	0,9984	43	-52,2
	double-réc	0,0257	-0,2280	0,9752	113	-41,6
	isotherme	26,6670	-1,5302	1,0000	37	
	Moyenne				110 ± 98	-46,8 ± 5,3

3.2. Injection de l'aptamère

3.2.1. Influence de la concentration en magnésium sur le profil de l'aptamère

Afin d'étudier l'influence de la concentration en magnésium sur le comportement électrophorétique de l'aptamère anti-thrombine, des solutions d'aptamère à 10 μM dans l'électrolyte contenant une concentration variable de MgCl_2 (0 – 10 mM), activées

thermiquement ou non, ont été analysées par CZE dans le borate de sodium 20 mM pH 9,5. Contrairement à ce qui avait été observé pour l'aptamère anti-lysozyme, cette étude n'a mis en évidence aucune influence notable de la concentration en magnésium ni de l'activation thermique sur le comportement électrophorétique de l'aptamère anti-thrombine (mobilité et profil). Ces observations corroborent certaines études selon lesquelles la structure G-quartet responsable de l'affinité de l'aptamère pourrait se former en l'absence de cation stabilisant [17], contrairement à ce qui est généralement admis.

3.2.2. Mise en œuvre de l'électrophorèse capillaire d'affinité

La migration électrophorétique de l'aptamère anti-thrombine (5 μM dans l'électrolyte borate de sodium 20 mM (pH 9,5) + MgCl_2 1 mM, activé thermiquement) est réalisée dans un capillaire en silice vierge, dans des électrolytes borate de sodium 20 mM (pH 9,5) contenant une concentration croissante de thrombine (0,05 – 5 μM). Trois injections successives sont réalisées pour chaque concentration en thrombine. Des mesures de viscosité sont également réalisées pour chaque électrolyte afin d'effectuer la correction des mobilités expérimentales. La Figure 18 présente l'allure des profils électrophorétiques obtenus selon la concentration en thrombine dans l'électrolyte.

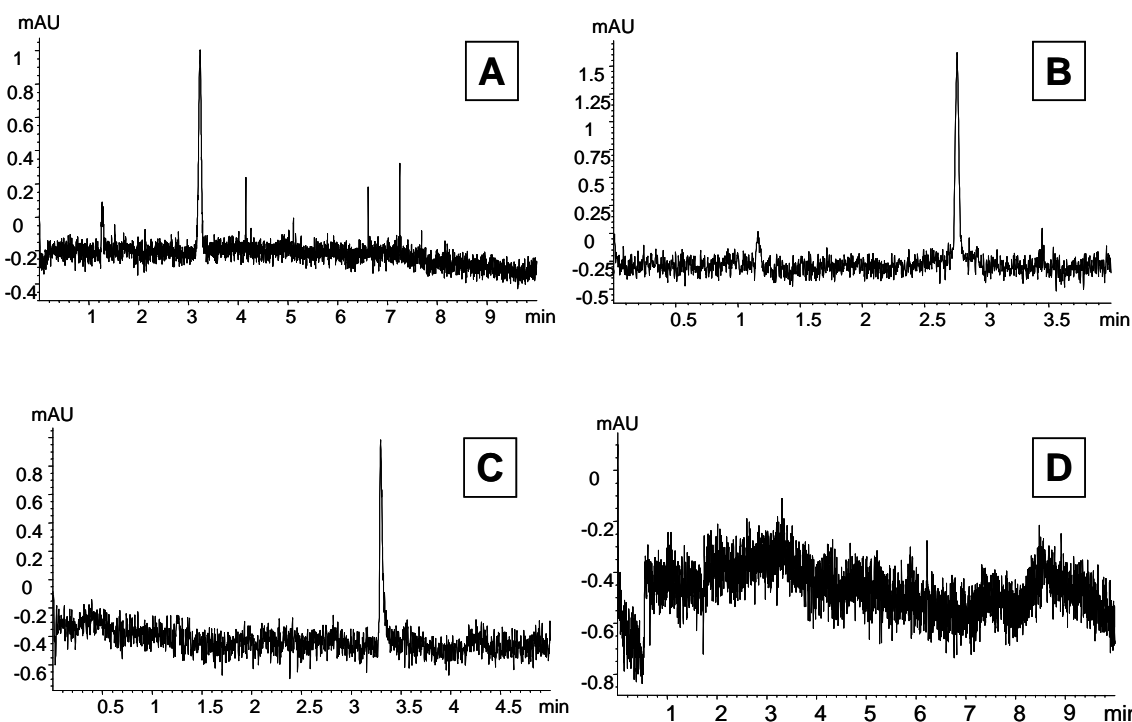


Figure 18 : évolution du profil électrophorétique de l'aptamère anti-thrombine lors de l'ajout de la thrombine 0 μM (A), 0,1 μM (B), 0,5 μM (C) et 1 μM (D) dans l'électrolyte de séparation. Capillaire en silice vierge : 50 μm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Electrolyte de séparation : borate de sodium 20 mM (pH 9,5) + thrombine 0,05 – 5 μM . Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Echantillon : aptamère anti-thrombine 5 μM dans le borate de sodium 20 mM,

pH 9,5 + MgCl_2 1 mM. Injection hydrodynamique : MN (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +20 kV. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 254 nm.

A partir d'une concentration en thrombine de 1 μM , l'aptamère n'est plus visualisé. Ceci pourrait être dû à un phénomène de diffusion par effet Joule, causé par l'augmentation du courant (voisin de 60 μA pour une concentration en thrombine de 1 μM , au lieu de 40 μA en l'absence de thrombine). Les données ne pourront donc être exploitées que pour une concentration en thrombine inférieure à 1 μM . Dans cette gamme de concentration, le courant observé est relativement stable : les variations de force ionique seront donc négligées.

3.2.3. Exploitation des résultats

Après correction des longueurs de migration et de la viscosité, la mobilité électrophorétique de l'aptamère anti-thrombine a été tracée en fonction de la concentration en thrombine dans l'électrolyte. L'isotherme d'adsorption obtenue (Figure 19) montre une augmentation de la valeur absolue de la mobilité de l'aptamère lorsque la concentration en thrombine dans l'électrolyte augmente.

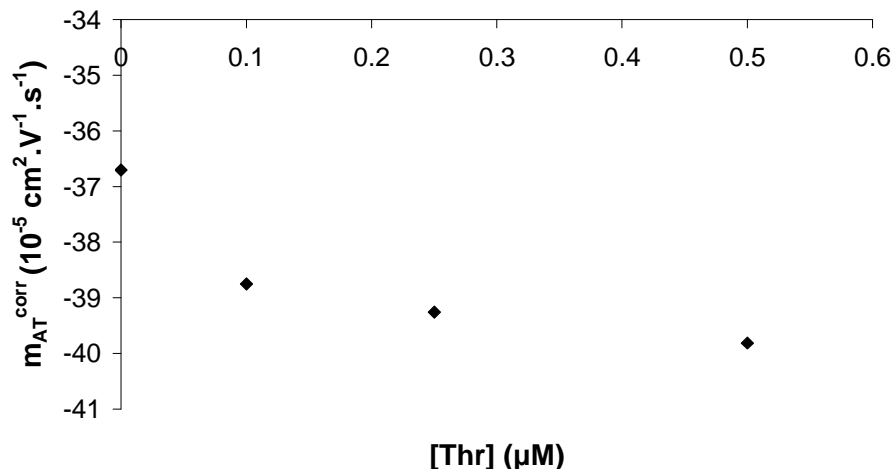


Figure 19 : isotherme d'adsorption de l'aptamère anti-thrombine : mobilité électrophorétique corrigée de l'aptamère (AT) en fonction de la concentration en thrombine (Thr) dans l'électrolyte. Conditions : cf. Figure 18.

L'évolution observée ne peut être attribuée à une variation de la force ionique : en effet, l'augmentation de celle-ci conduirait à une diminution de la mobilité (en valeur absolue), ce qui est contraire à l'évolution observée. En outre, la variation de courant est négligeable, ce qui indique que la force ionique de l'électrolyte est quasi-constante. L'évolution observée et la constante d'affinité qui en découle semblent donc représentatives de l'interaction étudiée.

Les représentations graphiques obtenues via les différentes méthodes mathématiques de linéarisation de l'isotherme sont présentées Figure 20. Les équations des droites correspondantes, ainsi que les constantes de dissociation (K_d) et les mobilités du complexe (m_{cplx}^0) qui en découlent figurent dans le Tableau 8.

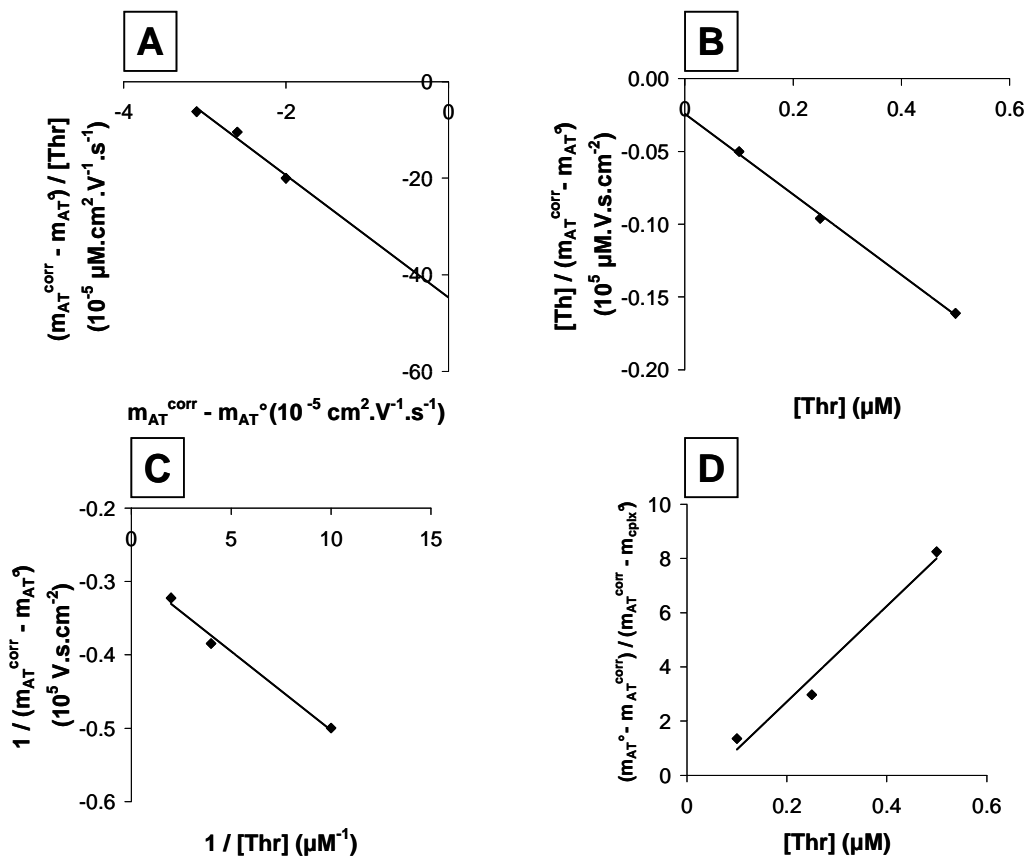


Figure 20 : linéarisation de l'isotherme d'adsorption de l'aptamère anti-thrombine par la méthode x-réciproque (A), y-réciproque (B), double-réciproque (C) et isotherme (D). Conditions : cf. Figure 18.

Le K_d obtenu (75 ± 13 nM) est légèrement inférieur aux valeurs reportées dans la littérature (240 ± 16 nM [1] et ~ 450 nM [3]) ainsi qu'à celles déterminées dans la première configuration. La dispersion est plus faible que dans la configuration précédente et du même ordre de grandeur que celle reportée dans la littérature. Ceci peut s'expliquer par une meilleure homogénéité des valeurs obtenues via les différentes méthodes. La mobilité du complexe ($-37,9 \pm 4,1 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) s'apparente à celle obtenue précédemment pour l'interaction avec le pic Thr1 de la thrombine ($-33,6 \pm 4,0 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). On remarquera notamment que cette valeur est différente de celle correspondant au pic « inconnu » observé lors de l'injection directe du mélange ($m_{\text{ep}} = -9,9 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), ce qui confirme qu'il s'agissait vraisemblablement d'une impureté et non du complexe aptamère-thrombine.

La différence entre le K_d obtenu et les valeurs reportées dans la littérature peut provenir de l'utilisation de conditions opératoires différentes, notamment en ce qui concernent le tampon d'incubation de l'aptamère (borate de sodium 20 mM, $MgCl_2$ 1 mM (pH 9,5) au lieu de Tris-HCl 20mM, KCl 5mM, $MgCl_2$ 1mM (pH 8,3) [1] ou Na_2HPO_4 5mM, KH_2PO_4 5mM, $MgCl_2$ 2mM (pH 8,2) [3]).

Tableau 8 : équation des droites, constante de dissociation (K_d) et mobilité électrophorétique du complexe (m_{cplx}^0) obtenues par les différentes méthodes de linéarisation de l'isotherme d'adsorption de l'aptamère.

Méthodes	a	b	R^2	K_d (nM)	m_{cplx}^0 ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
x-réc	-12,6590	-44,6920	0,9715	79	-33,2
y-réc	-0,2764	-0,0242	0,9980	88	-40,3
double-réc	-0,0215	0,2877	0,9881	75	-40,2
isotherme	17,6290	-0,8042	0,9763	57	
Moyenne				75 ± 13	-37,9 ± 4,1

3.3. Comparaison des deux configurations

L'étude de l'interaction aptamère-thrombine par ACE a permis d'accéder à des valeurs de constante d'affinité cohérentes avec celles reportées dans la littérature. La deuxième configuration testée (injection de l'aptamère) semble plus favorable pour cette détermination, pour diverses raisons.

Tout d'abord, les profils électrophorétiques de l'aptamère présentent un pic unique, alors que ceux de la thrombine sont constitués de deux pics de mobilités différentes, dont l'identification est ambiguë. De plus, les valeurs de constantes d'affinité présentent une dispersion plus importante dans la première configuration que dans la deuxième. Enfin, l'injection de l'aptamère dans un électrolyte contenant la thrombine permet de limiter la consommation de l'aptamère par rapport à la configuration inverse.

Cette configuration semble en outre avoir levé en partie l'ambiguïté sur les deux pics visualisés lors de l'injection de la thrombine : les résultats (notamment la mobilité du complexe) semblent indiquer que le pic 1 interagit préférentiellement avec l'aptamère.

3.4. Etude complémentaire du lot n°2 de thrombine

3.4.1. Mise en œuvre de l'électrophorèse capillaire d'affinité

L'interaction entre l'aptamère et la thrombine issue du lot n°2 a également été étudiée, en employant la configuration 2 (injection de l'aptamère). On rappelle que ce lot ne contient

que 4% en masse de thrombine, le reste étant constitué majoritairement de sels de lyophilisat (chlorure et citrate de sodium). Les concentrations en thrombine utilisées par la suite tiennent compte de la teneur effective en protéine du produit.

La migration électrophorétique de l'aptamère anti-thrombine (25 μM dans l'électrolyte formiate de sodium 10 mM (pH 10,3) + MgCl_2 1 mM, activé thermiquement) est réalisée dans un capillaire en silice vierge, dans des électrolytes formiate de sodium 10 mM (pH 10,3) contenant une concentration croissante de thrombine (0,5 – 10 μM) dans une gamme identique à celle employée précédemment lors de l'étude du lot n°1. Cinq injections successives sont réalisées pour chaque concentration en thrombine. Un post-conditionnement (2 min eau, 5 min NaOH 0,1 M, 2 min eau sous une pression de 935 mbars) est réalisé entre chaque série de mesures afin de limiter l'éventuelle adsorption de la protéine. Des mesures de viscosité sont également réalisées pour chaque électrolyte. La Figure 21 présente l'allure des profils électrophorétiques obtenus selon la concentration en thrombine dans l'électrolyte. L'ajout de la thrombine dans l'électrolyte de séparation entraîne une augmentation rapide et importante du courant (passage de 27 à 50 μA avec l'ajout de 0,5 μM de thrombine, pour une tension appliquée de +30 kV), ce qui traduit une forte augmentation de la force ionique due aux sels présents dans la solution de thrombine. La tension de migration doit donc être adaptée à chaque concentration en thrombine afin de limiter la diffusion par effet Joule (maintien d'un courant < 50 μA).

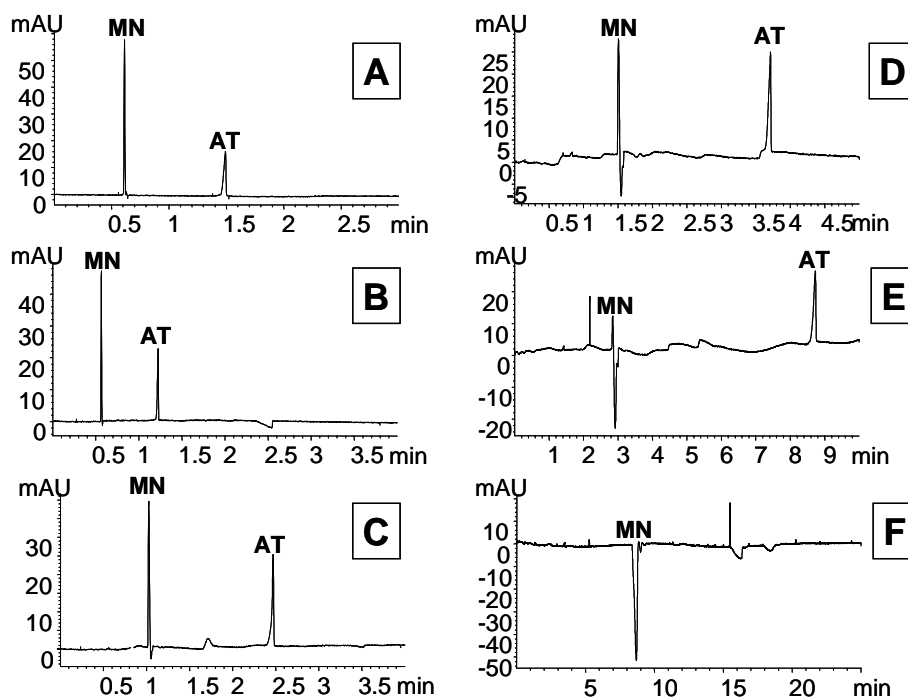


Figure 21 : évolution du profil électrophorétique de l'aptamère anti-thrombine lors de l'ajout de la thrombine 0 μM (A), 0,5 μM (B), 1 μM (C), 2,5 μM (D), 5 μM (E) et 10 μM (F) dans l'électrolyte de séparation. Capillaire en silice vierge : 50 μm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm).

Electrolyte de séparation : formiate de sodium 10 mM (pH 10,3) + thrombine 0,5 – 10 μM (lot n°2). Marqueur neutre (MN) : solution aqueuse de diméthylformamide (0,05% v/v). Echantillon : aptamère anti-thrombine 25 μM dans le formiate de sodium 10 mM (pH 10,3) + MgCl_2 1 mM, activé thermiquement. Injection hydrodynamique : MN (20 mbars, 5 s), BGE (30 mbars, 2 s), échantillon (20 mbars, 5 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : +30 kV (A, B), +20 kV (C), +15 kV (D), +10 kV (E) et +5 kV (F). Courant : 27 μA (A), 50 μA (B), 32 μA (C), 40 μA (D), 42 μA (E) et 35 μA (F). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm.

L'évolution du flux électroosmotique (après correction de viscosité) m_{eo}^{corr} en présence d'une quantité croissante de thrombine est présenté Figure 22. Lorsque la concentration en thrombine est faible (0 – 0,5 μM), on observe une légère augmentation du flux électroosmotique lors de l'augmentation de la concentration en thrombine, ce qui pourrait s'expliquer par l'existence d'une légère adsorption via des interactions hydrophobes. Pour les concentrations en thrombine plus élevées (> 0,5 μM), une diminution du flux est observée lors de l'augmentation de la concentration en thrombine, ce qui s'explique par l'augmentation de la force ionique de l'électrolyte.

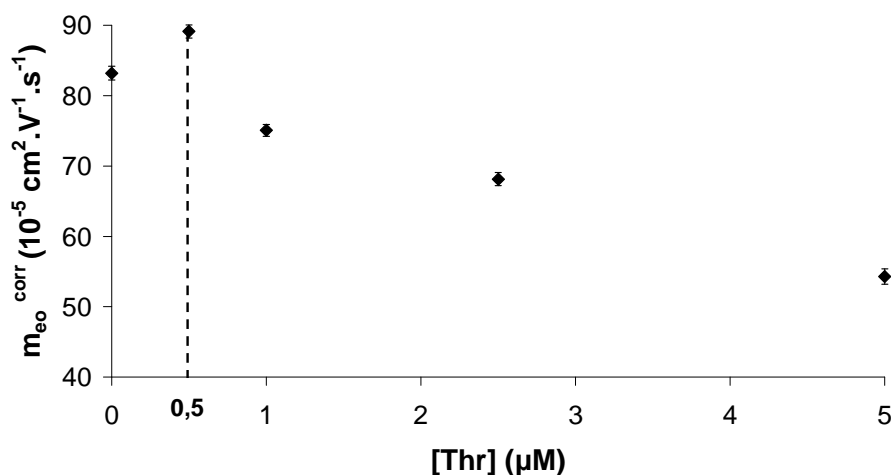


Figure 22 : évolution du flux électroosmotique (corrige de la viscosité) en fonction de la concentration en thrombine dans l'électrolyte formiate de sodium 10 mM pH 10,3. Conditions : cf. Figure 21.

3.4.2. Exploitation des résultats

Après correction des longueurs de migration et de la viscosité, la mobilité électrophorétique de l'aptamère anti-thrombine (sans correction de force ionique) a été tracée en fonction de la concentration en thrombine dans l'électrolyte. L'isotherme d'adsorption obtenue (Figure 23) montre une diminution de la valeur absolue de la mobilité de l'aptamère lorsque la concentration en thrombine dans l'électrolyte augmente, ce qui est contraire aux observations faites lors des expériences effectuées avec le lot n°1.

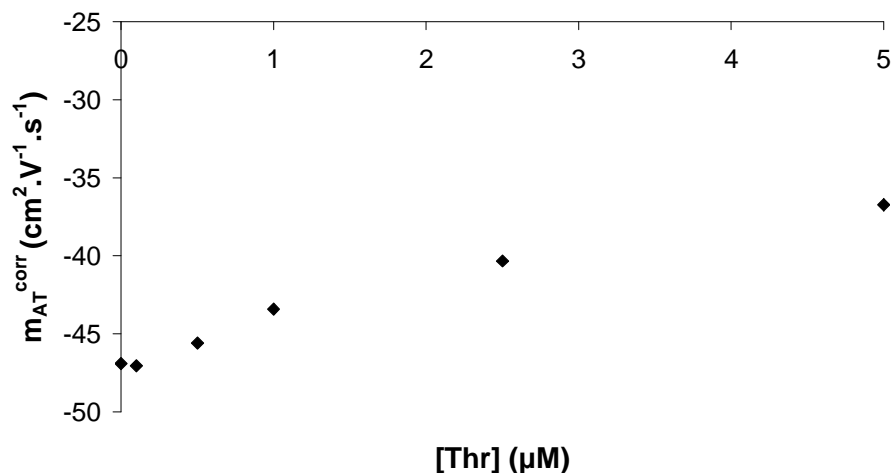


Figure 23 : isotherme d'adsorption de l'aptamère anti-thrombine : mobilité électrophorétique corrigée de l'aptamère (AT) en fonction de la concentration en thrombine (Thr) dans l'électrolyte. Conditions : cf. Figure 21.

Les représentations graphiques obtenues via les différentes méthodes mathématiques de linéarisation de l'isotherme sont présentées Figure 24.

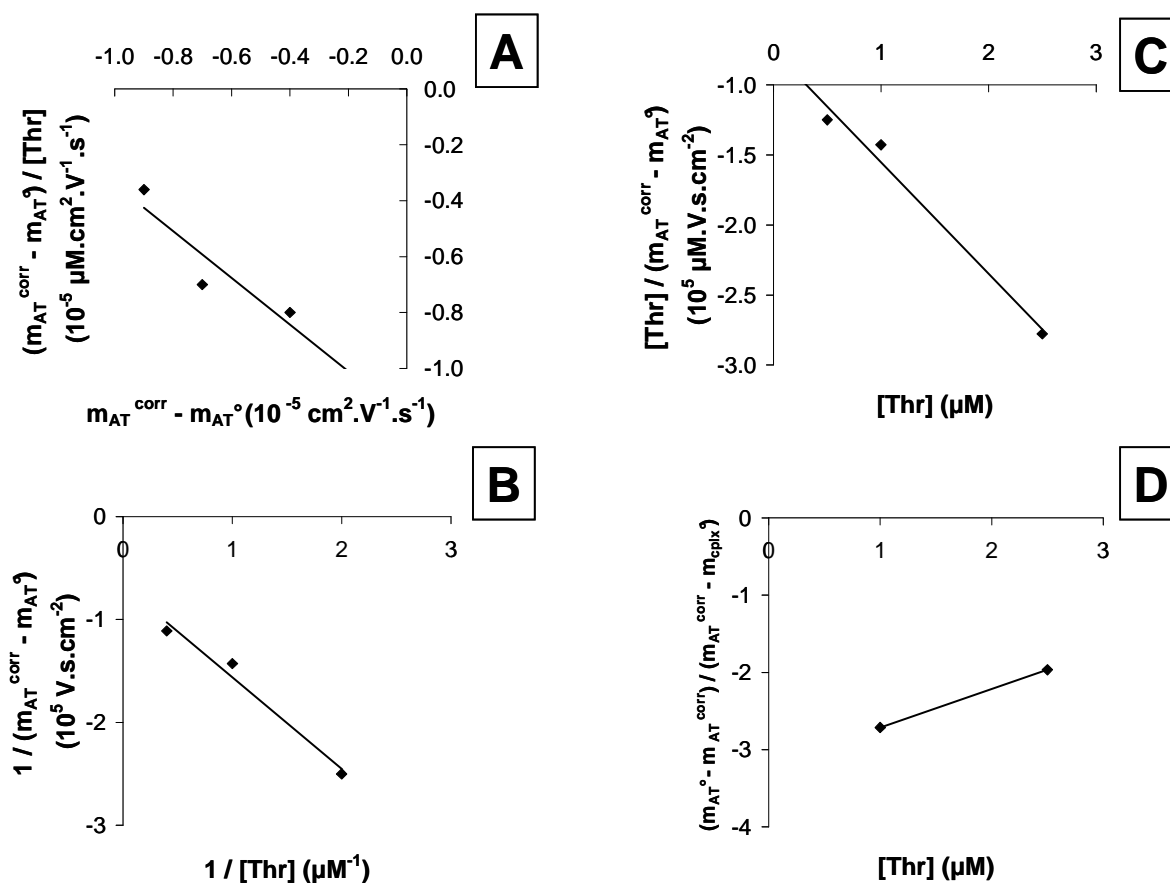


Figure 24 : linéarisation de l'isotherme d'adsorption de l'aptamère anti-thrombine par la méthode x-réciproque (A), y-réciproque (B), double-réciproque (C) et isotherme (D). Conditions : cf. Figure 21.

Les équations des droites correspondantes, ainsi que les constantes de dissociation (K_d) et les mobilités du complexe (m_{cplx}^0) qui en découlent figurent dans le Tableau 9. En l'absence de correction de force ionique, la constante de dissociation obtenue est plus élevée que celle observée avec le premier lot de thrombine ($K_d \sim 1 \mu\text{M}$ au lieu de 75 nM), ce qui reflète une affinité plus faible de l'aptamère. Ceci peut être une conséquence de l'augmentation de la force ionique de l'électrolyte, du fait de la teneur importante en sels de ce lot. Afin de déterminer si la diminution de mobilité observée (en valeur absolue) lors de l'ajout de la thrombine est due à la formation du complexe ou à l'augmentation de la force ionique, une correction supplémentaire des données doit être apportée.

Tableau 9 : équation des droites, constante de dissociation (K_d) et mobilité électrophorétique du complexe (m_{cplx}^0) obtenues par les différentes méthodes de linéarisation de l'isotherme d'adsorption de l'aptamère.

Méthodes	a	b	R ²	K _d (nM)	m _{cplx} ⁰ (10 ⁻⁵ cm ² .V ⁻¹ .s ⁻¹)
x-réc	-0,8368	-1,1779	0,8337	1195	-45,5
y-réc	-0,7952	-0,7585	0,9818	954	-48,2
double-réc	-0,8888	-0,6726	0,9745	1312	-48,4
isotherme	0,4984	7,3719	1	498	
Moyenne				990 ± 360	-47,3 ± 1,6

3.4.3. Prise en compte de l'effet de force ionique

Du fait de la forte concentration en sels de ce lot de thrombine (96%), l'exploitation des résultats doit tenir compte de l'augmentation de force ionique entraînée par l'ajout de la thrombine dans l'électrolyte, celle-ci conduisant à une diminution de mobilité électrophorétique de l'aptamère. Cette correction de force ionique a été réalisée par mesure expérimentale ainsi que par un calcul théorique.

3.4.3.1. Mise en évidence expérimentale

Une série d'expériences d'ACE a été menée selon le protocole utilisé précédemment en remplaçant la thrombine par du chlorure de sodium (Figure 26, carrés gris. Les résultats expérimentaux correspondent aux losanges noirs). La concentration en NaCl ajoutée a été ajustée de façon à ce que la force ionique apportée à l'électrolyte soit identique à celle apportée par la thrombine. Pour cela, un étalonnage a été réalisé, en reportant le courant correspondant à diverses concentrations en NaCl. La droite obtenue permet alors de déterminer la concentration en NaCl correspondant au courant relevé dans l'électrolyte contenant une concentration donnée de thrombine (Figure 25).

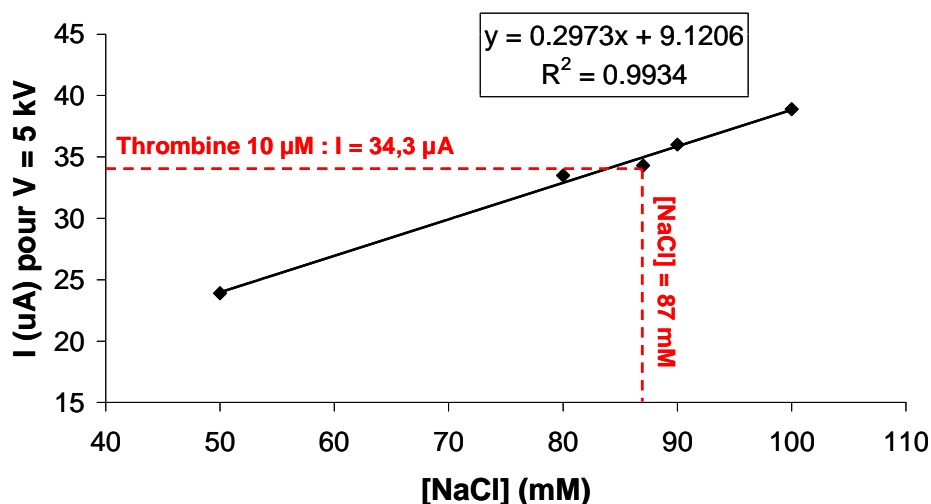


Figure 25 : courant généré dans l'électrolyte formate de sodium 10 mM pH 10,3 contenant différentes concentrations en NaCl et détermination de la concentration en NaCl équivalente. Capillaire en silice vierge : 50 µm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale. Electrolyte : formiate de sodium 10 mM (pH 10,3) + NaCl 50 – 100 mM. Tension appliquée : +5 kV. Température : 25°C.

L'équivalence entre les concentrations en thrombine et en NaCl ainsi que la force ionique des électrolytes correspondants sont reportées dans le Tableau 10.

Tableau 10 : concentration en thrombine dans l'électrolyte, concentration en NaCl équivalente et force ionique globale de l'électrolyte obtenu.

[Thr] (µM)	0	0,5	1,0	2,5	5,0
[NaCl] _{éq} (mM)	0	4,3	8,6	21,5	43
FI (mM)	10	14,3	18,6	31,5	53,0

3.4.3.2. Modélisation

La correction de force ionique peut également être réalisée via le calcul de la mobilité théorique de l'aptamère à la force ionique de l'électrolyte, selon le modèle empirique de Friedl [21] (Equation 7) :

$$m_{ep}(I) = m_{ep}(I_0) \exp(\omega\sqrt{zI_0}) \exp(-\omega\sqrt{zI}) \quad (7)$$

$m_{ep}(I)$ et $m_{ep}(I_0)$ sont respectivement la mobilité électrophorétique de l'aptamère à la force ionique I et à une force ionique de référence I_0 (en l'absence de thrombine dans l'électrolyte), z est la charge effective de l'aptamère et ω un facteur correctif (0,55 pour $z = 1$; 0,77 pour $z \geq 2$). Cette relation est valable pour des composés anioniques ($-1 \leq z \leq -6$) et pour des forces ioniques comprises entre 10^{-3} et 10^{-1} M.

L'aptamère anti-thrombine est composé de 15 nucléotides, guanine (G) ou thymine (T). Chaque nucléotide possède une charge totale théorique de -1,731 :

- (i) phosphate : 1 charge négative par nucléotide

- (ii) base azotée : charge partielle de -0,731 par nucléotide à pH 10,3 (pKa = 9,3 : forme acide (charge 0) : 26,9% ; forme basique (charge -1) : 73,1%)

L'aptamère possède donc une charge théorique $z_{théo} = 15 \times (-1,731) = -26$. Cependant, du fait du phénomène de condensation de contre-ions (cf. Chapitre III, partie 2), 75 à 80% de ces charges négatives sont écrantées par interaction avec les cations de l'électrolyte [22]. Une estimation de la charge effective de l'aptamère est donc : $z_{eff} = 0,2 z_{théo} = 0,2 \times (-26) = -5,2$. Pour chaque concentration en thrombine, la mobilité théorique de l'aptamère est donc calculée en appliquant l'Equation 10 avec $I_0 = 10$ mM, $\omega = 0,77$ et $z = 5,2$. La force ionique I de l'électrolyte est celle déterminée lors de la correction expérimentale par NaCl (Tableau 10). L'évolution de mobilité théorique obtenue est représentée sur la Figure 26 (ronds blancs).

3.4.3.3. Résultats

Après correction de viscosité, l'évolution de la mobilité électrophorétique de l'aptamère en fonction de la force ionique de l'électrolyte obtenue via ces deux approches a été comparée à celle observée en présence de thrombine (Figure 26).

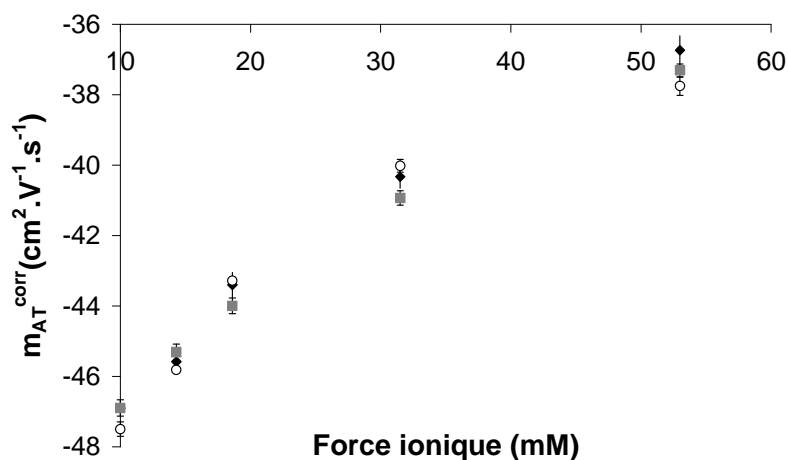


Figure 26 : évolution expérimentale de la mobilité électrophorétique de l'aptamère anti-thrombine en fonction de la force ionique de l'électrolyte formiate de sodium 10 mM (pH 10,3) contenant une concentration croissante de thrombine (losange noir) ou de NaCl (carré gris). Evolution théorique suivant le modèle de Friedl (rond blanc).

Les trois courbes se superposent quasi-parfaitement, ce qui permet de tirer les conclusions suivantes :

- (i) L'évolution de la mobilité électrophorétique de l'aptamère lors de l'ajout de thrombine dans l'électrolyte est uniquement due à l'augmentation de force ionique inhérente, et non à la formation du complexe, sans doute défavorisée par la teneur élevée en sels.

- (ii) Les modélisations expérimentale et théorique de l'effet de la force ionique conduisent aux mêmes résultats, ce qui montre la pertinence du modèle utilisé (Friedl) et valide l'estimation de la charge effective de l'aptamère.

3.4.4. Effet de la concentration en magnésium

L'effet de la concentration en magnésium dans l'électrolyte et dans l'échantillon d'aptamère a été évalué en effectuant trois séries d'expériences dans les conditions suivantes : (i) absence de magnésium dans l'électrolyte et dans l'échantillon, (ii) absence de magnésium dans l'électrolyte, magnésium 1 mM dans l'échantillon et (iii) magnésium 0,1 mM dans l'électrolyte et 1 mM dans l'échantillon. Dans tous les cas, l'évolution de la mobilité de l'aptamère observée semble due très majoritairement à la variation de force ionique induite par l'ajout de la thrombine. Il semble donc que les sels présents dans ce lot de thrombine inhibent l'interaction avec l'aptamère.

4. Conclusion

L'étude de l'interaction aptamère-thrombine par ACE avec détection UV a permis d'accéder à des valeurs de constante d'affinité cohérentes avec celles reportées dans la littérature. La configuration consistant à injecter l'aptamère dans un électrolyte contenant la thrombine est apparue préférable du fait de ses nombreux avantages :

- profil électrophorétique plus simple, constitué d'un pic unique
- plus faible dispersion des valeurs de constante d'affinité obtenues via les différentes méthodes de linéarisation
- limitation de la consommation d'aptamère

En présence d'une forte quantité de sels dans l'électrolyte de séparation, l'évolution de la mobilité électrophorétique de l'aptamère lors de l'ajout de thrombine dans l'électrolyte semble uniquement due à l'augmentation de force ionique inhérente, et non à la formation du complexe, sans doute défavorisée par la teneur élevée en sels. Les modélisations expérimentale et théorique de l'effet de la force ionique ont conduit à des résultats similaires, ce qui a permis de valider le modèle utilisé (modèle empirique de Friedl).

Références bibliographiques

- [1] Berezovski, M., Nutiu, R., Li, Y., Krylov, S. N., *Anal. Chem.* 2003, 75, 1382-1386.
- [2] Buchanan, D. D., Jameson, E. E., Perlette, J., Malik, A., Kennedy, R. T., *Electrophoresis* 2003, 24, 1375-1382.
- [3] German, I., Buchanan, D. D., Kennedy, R. T., *Anal. Chem.* 1998, 70, 4540-4545.
- [4] Huang, C.-C., Chang, H.-T., Cao, Z., Tan, W., *Anal. Chem.* 2004, 76, 6973-6981.
- [5] Butkowski, R. J., Elion, J., Downing, M. R., Mann, K. G., *J. Biol. Chem.* 1977, 252, 4942-4957.
- [6] Nilsson, B., Horne, M. K., III, Gralnick, H. R., *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1983, 224, 17-133.
- [7] Keesely, J., *Biochemica Information, 1st ed.*, p. 102.
- [8] <http://www.sigmaaldrich.com>.
- [9] Landis, B. H., Koehler, K. A., Fenton, J. W., II *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 4604-4610.
- [10] Seegers, W. H., *J. Biol. Chem.* 1940, 136, 103-111.
- [11] Tran, N. T., Taverna, M., Miccoli, L., Angulo, J. F., *Electrophoresis* 2005, 26, 3105-3112.
- [12] Fernas, S., Gonnet, F., Daniel, R., *Analytical Biochemistry* 2008, 372, 258-260.
- [13] Keniry, M. A., *Biopolymers (Nucleic Acids Sciences)* 2001, 56, 123-146.
- [14] Vairamani, M., Gross, M. L., *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 42-43.
- [15] Szilagyi, A., K. Bonn, G., Guttman, A., *J. Chromatogr. A* 2007, 1161, 15-21.
- [16] Marky, L. A., Kankia, B. I., *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 10799-10804.
- [17] Baldrich, E., O'Sullivan, C. K., *Anal. Biochem.* 2005, 341, 194-197.
- [18] Tsumoto, K., Nagatoishi, S., Tanaka, Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2007, 352, 812-817.
- [19] François, Y., Zhang, K., Varenne, A., Gareil, P., *Anal. Chim. Acta* 2006, 562, 164-170.
- [20] Varenne, A., Gareil, P., Collic-Jouault, S., Daniel, R., *Anal. Biochem.* 2003, 315, 152-159.
- [21] Friedl, W., Reijenga, J. C., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 1995, 709, 163-170.
- [22] Kontturi, A.-K., Kontturi, K., Urtti, A., *Eur. J. Pharm. Sci.* 2002, 15, 379-385.

Annexe 4

Etude de l'interaction aptamère – lysozyme par électrophorèse capillaire avec détection UV

1. Etude de l'interaction aptamère – lysozyme par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE)

Après avoir montré la faisabilité de l'étude de l'interaction aptamère-protéine en ACE-UV sur l'exemple du couple aptamère-thrombine (cf. Annexe 3), nous avons appliqué cette méthodologie à la caractérisation de l'interaction entre l'aptamère anti-lysozyme et sa cible. Ce système présente deux difficultés majeures par rapport à celui étudié précédemment :

- (i) nécessité de travailler en capillaire modifié afin de limiter l'adsorption du lysozyme, protéine fortement basique ;
- (ii) constante de dissociation plus faible d'un ordre de grandeur par rapport à celle du couple aptamère-thrombine ($\sim 10^{-8}\text{M}$ au lieu de $\sim 10^{-7}\text{M}$), et très inférieure à la sensibilité de la détection UV ($\sim 10^{-6}\text{M}$).

Afin de résoudre ce problème de sensibilité, l'étude de l'interaction aptamère-lysozyme sera également réalisée avec une détection de fluorescence.

1.1. ACE en capillaire HPC

D'après l'étude réalisée concernant la caractérisation du lysozyme en CZE, la modification permanente du capillaire par l'hydroxypropylcellulose (HPC) semble le compromis le plus efficace pour limiter l'adsorption du lysozyme tout en restant compatible avec l'analyse de l'aptamère. Cependant, du fait de l'existence d'une adsorption résiduelle du lysozyme, et afin de limiter la consommation de l'aptamère, seule la configuration consistant à injecter l'aptamère dans un électrolyte contenant le lysozyme sera mise en œuvre.

1.1.1. Mise en œuvre expérimentale

La migration électrophorétique de l'aptamère anti-lysozyme (20 μM dans l'électrolyte phosphate de sodium 30 mM (pH 7,0) + MgCl_2 1 mM, activé thermiquement : 90°C pendant 5 min) est réalisée dans un capillaire modifié HPC, dans des électrolytes phosphate de sodium 30 mM (pH 7,0) + MgCl_2 1 mM contenant une concentration croissante de lysozyme (0,5 – 10 μM). Trois injections successives sont réalisées pour chaque concentration en protéine. Un post-conditionnement acide (1 min eau, 4 min HCl 1 M, 5 min eau sous une pression de 935 mbars) est réalisé après chaque injection afin de désorber le lysozyme éventuellement adsorbé. Avant chaque injection, une mesure du flux électroosmotique résiduel est réalisée par la méthode de William et Vigh [1]. La Figure 27 présente l'allure des profils électrophorétiques obtenus selon la concentration en lysozyme dans l'électrolyte. L'augmentation de la concentration en lysozyme dans l'électrolyte de séparation conduit à une déformation et à un étalement progressifs du pic de l'aptamère. A partir d'une concentration en lysozyme de 4 μM , les électrophérogrammes sont difficilement analysables, sans doute du fait de la forte absorbance de l'électrolyte et de l'étalement du pic de l'aptamère. Pour les concentrations en lysozyme supérieures ou égales à 5 μM , on constate l'apparition d'un pic négatif aux alentours de 6 min de migration ($m_{ep} \sim -4.10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) qui pourrait correspondre à la formation du complexe. En effet, la complexation avec le lysozyme, de masse plus élevée et de charge opposée à l'aptamère, devrait conduire à une augmentation de la masse, et à une éventuelle diminution de la charge, aboutissant ainsi à une réduction théorique de la mobilité.

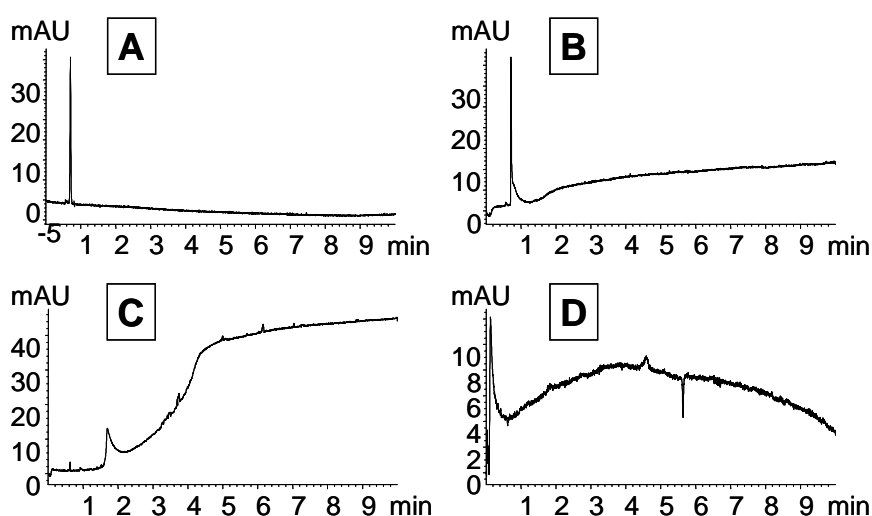


Figure 27 : évolution du profil électrophorétique de l'aptamère anti-lysozyme lors de l'ajout de lysozyme 0 μM (A), 1 μM (B), 2 μM (C), et 10 μM (D) dans l'électrolyte de séparation. Capillaire modifié HPC : 50 μm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30 mM (pH 7,0) + MgCl_2 1 mM + lysozyme 0,5 – 10 μM . Echantillon : aptamère anti-lysozyme (AL) 20

μM dans le phosphate de sodium 30 mM (pH 7,0) + MgCl_2 1 mM, activé thermiquement. Injection hydrodynamique : échantillon (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Tension appliquée : -20 kV. Post-conditionnement : 1 min eau, 4 min HCl 0,1 M, 5 min eau (935 mbars). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm.

La viscosité de chaque électrolyte est déterminée par une série de mesures indépendantes réalisée dans un capillaire en silice vierge (4 mesures par électrolyte) afin de réaliser une correction de viscosité sur la mesure de la mobilité électrophorétique. Après chaque analyse, un post conditionnement est mis en œuvre afin de désorber la protéine éventuellement adsorbée : 1 min eau, 3 min HCl 10 mM, 1 min eau, 3 min MeOH, 2 min eau (pression de 935 mbars). La faible variation de courant observée ($\Delta I < 1 \mu\text{A}$, soit 4% de variation lors de l'ajout de 10 μM de lysozyme) permet de négliger la variation de force ionique engendrée par l'ajout de du lysozyme dans l'électrolyte.

1.1.2. Exploitation des résultats

La détermination du temps de migration de l'aptamère est délicate du fait de la déformation progressive du pic lorsque la concentration en lysozyme dans l'électrolyte augmente. Afin de ne pas surestimer la mobilité de l'aptamère, le temps de migration t_m considéré est celui correspondant au milieu du massif, obtenu selon le calcul suivant (Equation 8) :

$$t_m = t_{deb} - \frac{(t_{fin} - t_{deb})}{2} \quad (8)$$

t_{deb} et t_{fin} sont les temps correspondant respectivement aux bornes inférieure et supérieure du massif de l'aptamère.

Le flux électroosmotique résiduel est stable et très faible ($\leq 0,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) ; cependant, la mobilité électrophorétique de l'aptamère est calculée en tenant compte de cette valeur. Une très légère augmentation du courant est observée lors de l'ajout du lysozyme dans l'électrolyte ($< 5\%$ pour les concentrations en lysozyme les plus élevées) ; la variation de force ionique sera donc considérée comme négligeable.

Après correction des longueurs de migration et de la viscosité, la mobilité électrophorétique de l'aptamère anti-lysozyme a été tracée en fonction de la concentration en lysozyme dans l'électrolyte. L'isotherme d'adsorption obtenue (Figure 28) montre une diminution de la valeur absolue de la mobilité de l'aptamère lorsque la concentration en lysozyme dans l'électrolyte augmente. Ceci peut s'expliquer par le fait que la complexation de l'aptamère chargé négativement avec le lysozyme chargé positivement pourrait conduire à

une diminution de la charge et à une augmentation de la taille, et donc à une diminution du rapport charge/taille.

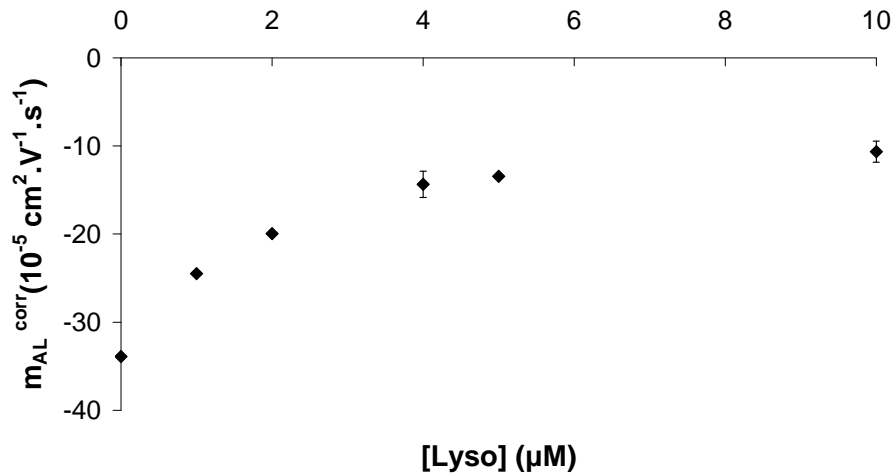


Figure 28 : isotherme d'adsorption de l'aptamère anti-thrombine : mobilité électrophorétique corrigée de l'aptamère anti-lysozyme (AL) en fonction de la concentration en lysozyme (Lyso) dans l'électrolyte. Conditions : cf. Figure 27.

Les représentations graphiques obtenues via les différentes méthodes mathématiques de linéarisation de l'isotherme sont présentées Figure 29.

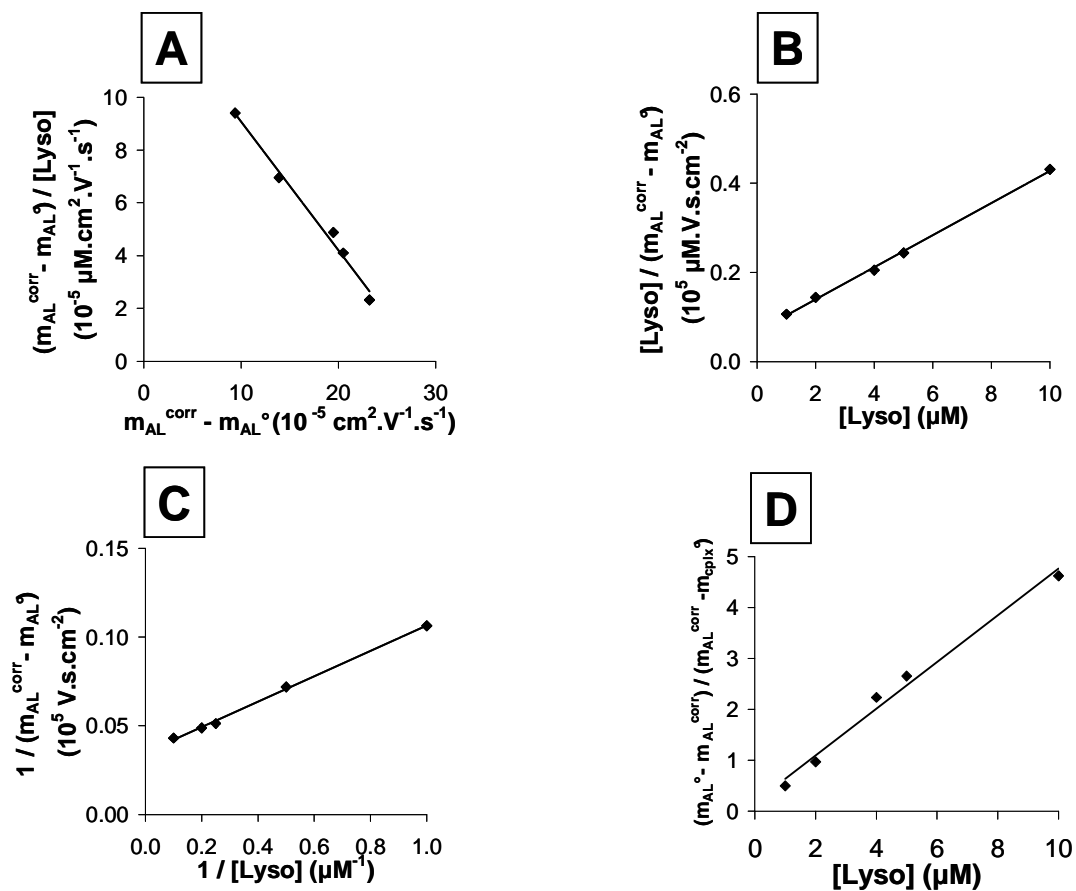


Figure 29 : linéarisation de l'isotherme d'adsorption de l'aptamère anti-lysozyme par la méthode x-réciproque (A), y-réciproque (B), double-réciproque (C) et isotherme (D). Conditions : cf. Figure 27.

Les équations des droites correspondantes, ainsi que les constantes de dissociation (K_d) et les mobilités du complexe (m_{cplx}^0) qui en découlent figurent dans le Tableau 11.

Tableau 11 : équation des droites, constante de dissociation (K_d) et mobilité électrophorétique du complexe (m_{cplx}^0) obtenues par les différentes méthodes de linéarisation de l'isotherme d'adsorption de l'aptamère.

Méthodes	a	b	R ²	K _d (μM)	m _{cplx} ⁰ (10 ⁻⁵ cm ² .V ⁻¹ .s ⁻¹)
x-réc	-0,4876	13,959	0,9879	2,05	-5,3
y-réc	0,0360	0,0677	0,9985	1,88	-6,1
double-réc	0,0717	0,0349	0,9981	2,05	-5,2
isotherme	0,4588	0,1793	0,9868	2,18	-
Moyenne				2,0 ± 0,1	-5,7 ± 0,6

La mobilité du complexe déterminée par linéarisation ($-5,7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) est cohérente avec l'apparition d'un pic de mobilité $\sim -4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ aux fortes concentrations en lysozyme. En revanche, la valeur de K_d obtenue (2,0 μM) est supérieure de deux ordres de grandeurs à celle reportée dans la littérature (31 nM). Cette faible affinité peut être attribuée à une interaction non spécifique entre l'aptamère et le lysozyme, via des liaisons électrostatiques entre les deux partenaires de charges opposées. Afin de pouvoir visualiser l'interaction spécifique, il faudrait diminuer les concentrations en aptamère et en lysozyme ($\sim 10^{-8} \text{ M}$), ce qui est difficilement envisageable compte tenu de la sensibilité de la détection UV ($\sim 10^{-6} \text{ M}$).

1.2. ACE en capillaire HPC avec mesure simultanée de m_{eo} et m_{AL}

L'emploi d'un capillaire modifié HPC conduisant à de très faibles valeurs de flux électroosmotique, celui-ci doit être déterminé indépendamment via une méthode spécifique, ce qui allonge les temps d'analyse et peut générer des imprécisions dans la détermination de la mobilité électrophorétique de l'aptamère (le flux résiduel pouvant présenter de légères variations d'une analyse sur l'autre). Afin de pallier ce problème, une nouvelle méthodologie couplant la méthode de William et Vigh [1] et le mode ACE a été développée, consistant à déterminer simultanément le flux résiduel et la mobilité de l'aptamère.

1.2.1. Mise en œuvre expérimentale

La méthode est similaire à celle employée pour la détermination du flux résiduel par la méthode de William et Vigh [1], à l'exception du protocole d'injection qui introduit

l'injection d'une zone d'aptamère après la deuxième zone de neutre. La Figure 30 présente l'allure des profils électrophorétiques obtenus selon la concentration en lysozyme dans l'électrolyte. Ceux-ci comportent deux ensembles distincts :

- (i) un ensemble de trois pics fins, régulièrement espacés, correspondant aux trois zones de marqueur neutre injectées ;
- (ii) le pic de l'aptamère, qui présente une déformation et un élargissement progressif lors de l'augmentation de la concentration en lysozyme dans l'électrolyte.

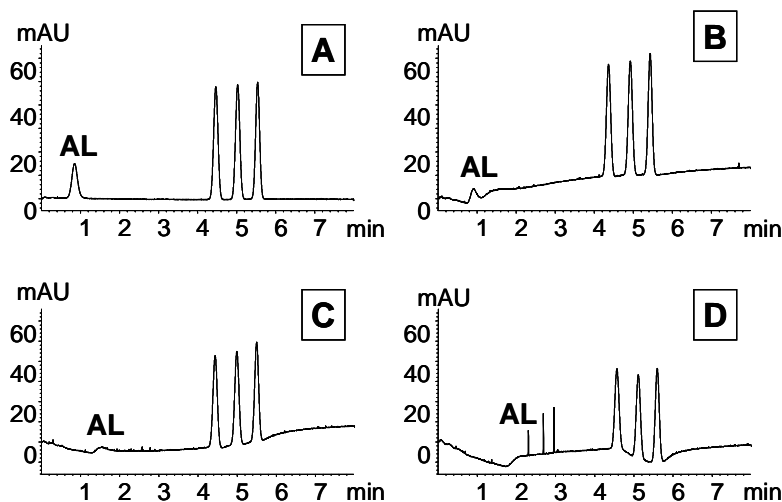


Figure 30 : évolution du profil électrophorétique de l'aptamère anti-lysozyme (AL) lors de l'ajout de lysozyme 0 μM (A), 1 μM (B), 2 μM (C), et 3 μM (D) dans l'électrolyte de séparation, en mode ACE couplé à la méthode de William et Vigh. Capillaire modifié HPC : 50 μm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 8,5 cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium 30 mM (pH 7,0) + MgCl_2 1 mM + lysozyme 0,35 – 10 μM . Echantillon : aptamère anti-lysozyme (AL) 20 μM dans le phosphate de sodium 30 mM (pH 7,0) + MgCl_2 1 mM, activé thermiquement. Injection hydrodynamique : neutre (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 30 s), neutre (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 25 s), aptamère (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2). Migration électrophorétique : -15 kV, 150 s. Injection hydrodynamique : neutre (30 mbars, 3 s), BGE (30 mbars, 2 s). Percolation : 30 mbars. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm.

1.2.2. Exploitation des résultats

Du fait de la déformation et de l'élargissement progressif du massif de l'aptamère, le temps de migration est relevé au milieu de celui-ci (Equation 11). Après correction des longueurs de migration et de la viscosité, la mobilité électrophorétique de l'aptamère anti-lysozyme a été tracée en fonction de la concentration en lysozyme dans l'électrolyte. L'isotherme d'adsorption obtenue (Figure 31) montre une diminution de la valeur absolue de la mobilité de l'aptamère lorsque la concentration en lysozyme dans l'électrolyte augmente, ce qui est cohérent avec les observations faites en ACE classique.

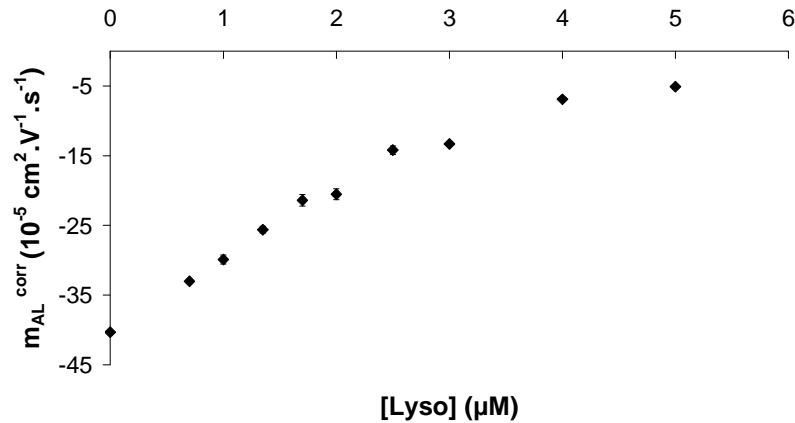


Figure 31 : isotherme d'adsorption de l'aptamère anti-thrombine : mobilité électrophorétique corrigée de l'aptamère anti-lysozyme (AL) en fonction de la concentration en lysozyme (Lyso) dans l'électrolyte. Conditions : cf. Figure 30.

Les représentations graphiques obtenues via les différentes méthodes mathématiques de linéarisation de l'isotherme sont présentées Figure 32.

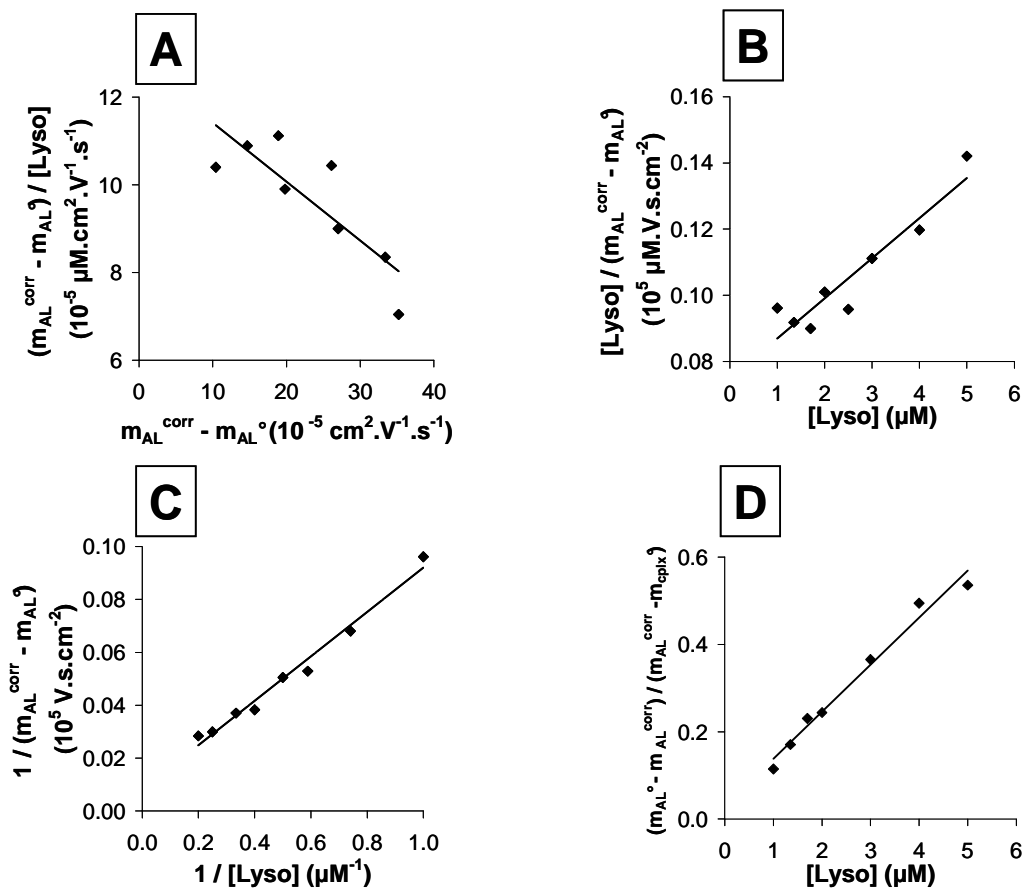


Figure 32 : linéarisation de l'isotherme d'adsorption de l'aptamère anti-lysozyme par la méthode x-réciproque (A), y-réciproque (B), double-réciproque (C) et isotherme (D). Conditions : cf. Figure 30.

Les équations des droites correspondantes, ainsi que les constantes de dissociation (K_d) et les mobilités du complexe (m_{cplx}^0) qui en découlent figurent dans le Tableau 12. La constante de dissociation obtenue (3,6 μM) est du même ordre de grandeur que celle obtenue en ACE ;

comme précédemment, cette valeur est trop élevée par rapport à celle attendue, du fait de l'inadéquation de la gamme de concentration employée. En revanche, la mobilité du complexe obtenue est positive ($12,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), à l'inverse de ce qui a été observé précédemment, mais sa valeur relativement faible reste compatible avec l'asymptote de l'isotherme d'adsorption. Cette valeur n'est pas incohérente puisque le système est constitué dans les conditions d'analyse de lysozyme positivement chargé et d'aptamère négativement chargé.

Tableau 12 : équation des droites, constante de dissociation (K_d) et mobilité électrophorétique du complexe (m_{cplx}^0) obtenues par les différentes méthodes de linéarisation de l'isotherme d'adsorption de l'aptamère.

Méthodes	a	b	R ²	K _d (μM)	m _{cplx} ⁰ (10 ⁻⁵ cm ² ·V ⁻¹ ·s ⁻¹)
x-réc	-0,2756	12,6490	0,7035	3,6	10,7
y-réc	0,0219	0,0765	0,8956	3,5	10,5
double-réc	0,0700	0,0195	0,9869	3,6	16,1
isotherme	0,2538	0,0800	0,9800	3,9	-
Moyenne				3,6 ± 0,2	12,4 ± 4,0

2. Etude de l'interaction aptamère – lysozyme par analyse frontale électrocinétique continue (FACCE)

Les paramètres de l'interaction entre l'aptamère anti-lysozyme et sa cible ont également été déterminés par analyse frontale électrocinétique continue (FACCE). Le capillaire a été modifié de façon permanente par l'hydroxypropylcellulose (HPC) afin de limiter l'adsorption du lysozyme. L'injection électrocinétique continue de mélanges aptamère / lysozyme a été réalisée, dans un électrolyte MOPS/NaOH 30 mM (pH 7). Compte tenu de l'existence d'une adsorption résiduelle du lysozyme, une tension négative (-10 kV) est appliquée afin de visualiser le front de migration de l'aptamère libre sans introduire le lysozyme libre.

2.1. Etalonnage de la hauteur du palier de concentration de l'aptamère

Dans un premier temps, nous avons vérifié la linéarité de la hauteur des paliers de concentration de l'aptamère libre en fonction de sa concentration dans le mélange injecté.

Pour cela, l'aptamère anti-lysozyme seul a été injecté en mode FACCE, dans les conditions décrites précédemment, à 6 niveaux de concentration compris entre 5 et 50 μM . Le palier de concentration obtenu étant parfaitement horizontal, la détermination de sa hauteur est effectuée sans ambiguïté (Figure 33A).

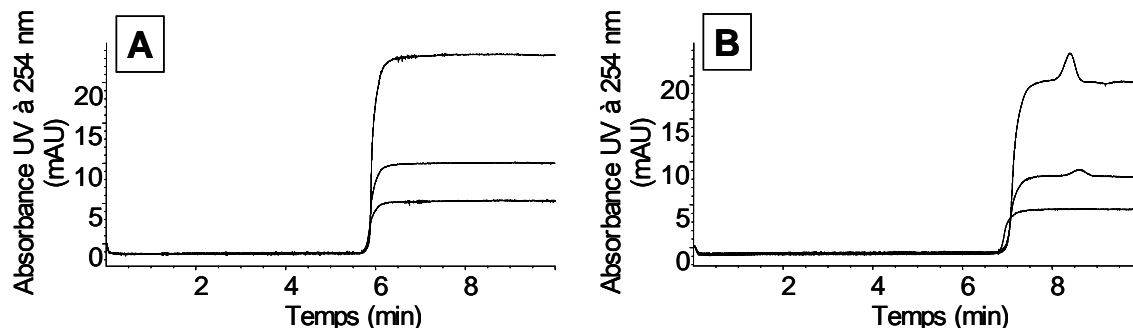


Figure 33 : électrophérogrammes obtenus par injection électrocinétique continue de l'aptamère (mode FACCE) à différentes concentrations (5 μM , 10 μM et 20 μM) en absence (A) ou en présence de magnésium (B). Capillaire modifié HPC : 50 μm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Echantillon : solution d'aptamère anti-lysozyme 5 - 20 μM dilué dans l'électrolyte de séparation. Electrolyte de séparation : MOPS/NaOH 30 mM (pH 7,0) + MgCl_2 0 mM (A) ou 10 mM (B). Injection électrocinétique continue. Tension appliquée : -10 kV. Température : 25°C. Détection UV : 254 nm.

Une corrélation linéaire entre la concentration en aptamère et la hauteur du palier est obtenue sur la gamme 5 - 20 μM (Figure 34A), alors que la linéarité est vérifiée sur la gamme 5 – 50 μM pour l'aire corrigée du pic obtenu en CZE (Figure 34B). Une bonne répétabilité intra-échantillon ($\text{CV} < 2,5\%$) et inter-échantillon ($\text{CV} < 10\%$) a été observée. Les mesures complémentaires de viscosité effectuées ont montré une viscosité quasi-constante des solutions d'aptamère sur la gamme de concentration étudiée, ce qui n'a pas permis d'expliquer l'écart à la linéarité pour la hauteur du palier observé au-delà de 20 μM par un éventuel phénomène de dimérisation.

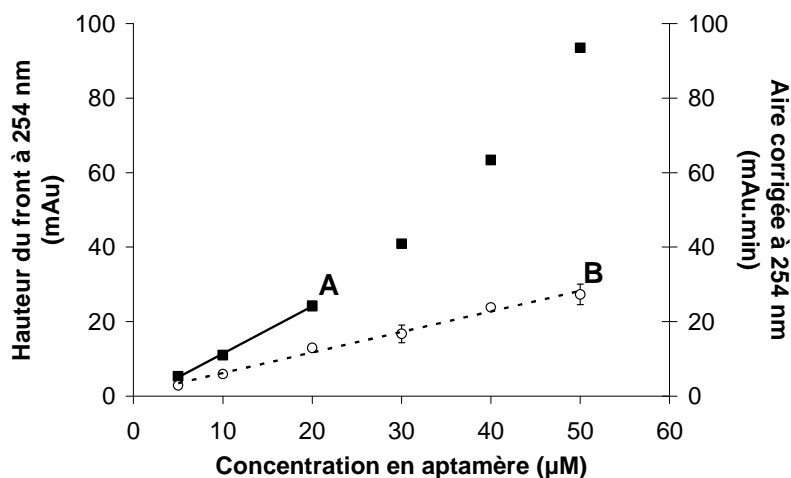


Figure 34 : corrélation entre la concentration en aptamère anti-lysozyme injectée et la hauteur du palier de concentration (A) ou l'aire corrigée (B) de l'aptamère. Equations des droites de régression linéaire : A ($n = 3$) : $y = 1,2686x - 1,3$ ($R^2 = 0,9988$) ; B ($n = 6$) : $y = 0,5506x + 0,6921$ ($R^2 = 0,9912$).

Capillaire modifié HPC : 50 μm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Echantillon : solution d'aptamère anti-lysozyme 5 – 50 μM dilué dans l'électrolyte de séparation. Electrolyte de séparation : MOPS/NaOH 30 mM (pH 7,0). Injection électrocinétique continue (A) ou hydrodynamique (B). Tension appliquée : -10 kV. Température : 25°C. Détection UV : 254 nm.

L'étalonnage a également été réalisé en présence de magnésium dans l'électrolyte. Les profils obtenus en mode FACCE dans ces conditions présentent une légère perturbation peu après le front de migration, suivie d'un palier horizontal (Figure 33B). De plus, la hauteur du palier à 254 nm est plus faible (Figure 35B) que celle obtenue en l'absence de magnésium (Figure 35A) (diminution de 30% en présence de MgCl_2 10 mM). L'activation thermique préalable de l'aptamère conduit à la disparition de ces perturbations ainsi qu'à une diminution supplémentaire (environ 20%) de la hauteur du palier (Figure 35C). Ces résultats pourraient indiquer l'existence d'un changement de conformation de l'aptamère en présence de magnésium, comme notre étude de l'interaction aptamère-cation le suggère [2].

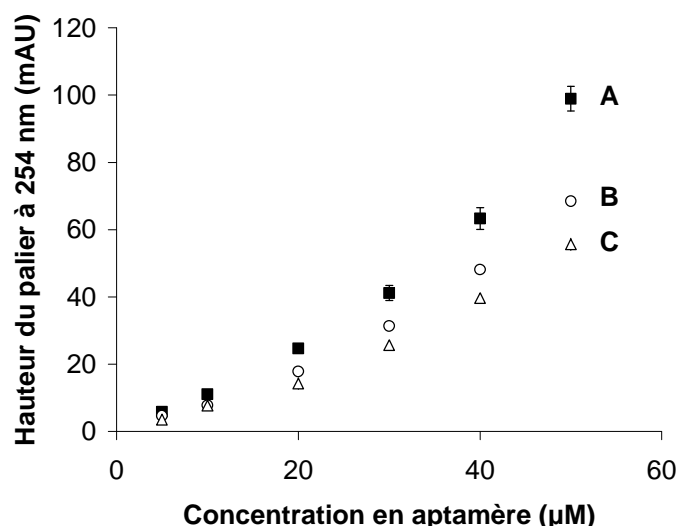


Figure 35 : corrélation entre la concentration en aptamère anti-lysozyme injectée et la hauteur du palier de concentration obtenu en l'absence de magnésium (A) et en présence de magnésium sans (B) ou avec activation thermique (C). Capillaire modifié HPC : 50 μm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Echantillon : solution d'aptamère anti-lysozyme 5 - 50 dilué dans l'électrolyte de séparation. Electrolyte de séparation : MOPS/NaOH 30 mM (pH 7,0) + MgCl_2 0 mM (A) ou 10 mM (B et C). Activation thermique (C) : 5 min à 95°C, refroidissement > 30 min à T_{amb} . Injection électrocinétique continue. Tension appliquée : -10 kV. Température : 25°C. Détection UV : 254 nm.

2.2. Etude de l'interaction aptamère – lysozyme par FACCE

Au vu des tailles respectives des deux partenaires du système, le lysozyme peut être considéré comme le substrat (S) et l'aptamère comme le ligand (L). L'interaction entre l'aptamère anti-lysozyme et sa cible peut être décrite par l'équilibre suivant (Equation 9), où n correspond au nombre de sites d'interaction du lysozyme (cf. Chapitre 3) :



Deux configurations ont été envisagées pour l'étude de l'interaction aptamère – lysozyme par FACCE :

- (i) injection de mélanges contenant une concentration variable d'aptamère et une concentration constante de lysozyme ;
- (ii) injection de mélanges contenant une concentration constante d'aptamère et une concentration variable de lysozyme.

2.2.1. Injection de mélanges contenant une concentration variable d'aptamère et une concentration constante de lysozyme

2.2.1.1. En l'absence de magnésium dans l'électrolyte de séparation

Des mélanges aptamère – lysozyme, de concentration constante en lysozyme (20 μM) et de concentrations variables, réparties en 7 niveaux, en aptamère anti-lysozyme (5 – 50 μM) ont été préparés dans l'électrolyte MOPS/NaOH 30 mM (pH 7,0) puis analysés par électrophorèse capillaire en mode FACCE. Les électrophérogrammes obtenus se composent d'un front de migration prolongé d'un palier de concentration horizontal, de mobilité voisine de $-30 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, attribué à l'aptamère libre présent dans le mélange (Figure 36). A partir d'une concentration en aptamère de 40 μM , ce palier est suivi d'un second palier d'absorbance croissante (Figure 36a-b), qui pourrait correspondre à l'adsorption du complexe sur la paroi du capillaire.

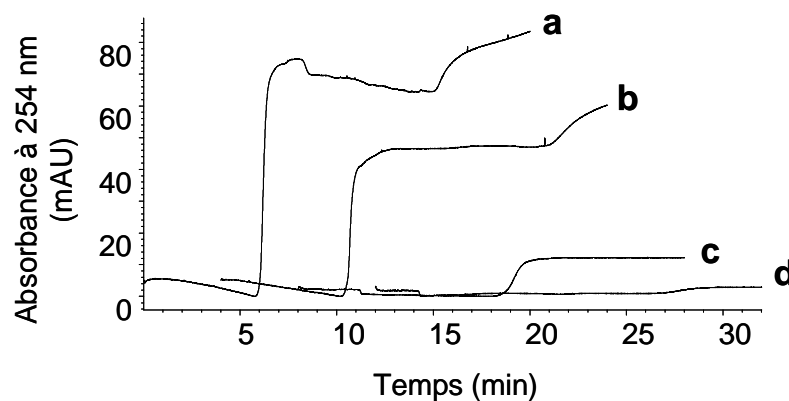


Figure 36 : électrophérogrammes obtenus par injection en mode FACCE de mélanges lysozyme 20 μM - aptamère 50 (a), 40 (b), 20 (c) et 10 μM (d). Capillaire modifié HPC : 50 μm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Echantillon : mélange lysozyme 20 μM + aptamère anti-lysozyme 0 – 50 μM , incubé dans l'électrolyte de séparation. Electrolyte de séparation : MOPS/NaOH 30 mM (pH 7,0). Injection électrocinétique continue. Tension appliquée : -10 kV. Température : 25°C. Détection UV : 254 nm

La concentration en aptamère libre est déduite de la hauteur du palier en utilisant la droite d'étalonnage établie précédemment (Figure 34A). Les données expérimentales ont été exploitées en faisant jouer au lysozyme le rôle de substrat et à l'aptamère celui de ligand. La

concentration en aptamère étant variable, la détermination des paramètres de l'interaction est basée sur l'évolution de la concentration en ligand (aptamère) libre, directement mesurable. L'isotherme d'adsorption (Figure 37A) et ses formes linéarisées (x-réciproque ou représentation de Scatchard, y-réciproque et double-réciproque) (Figure 37B-D) sont ensuite obtenues via les équations établies dans l'annexe. Une linéarité acceptable est obtenue sur la gamme de concentration 10 – 30 μM en aptamère, ce qui correspond à une concentration en aptamère libre située dans la gamme de linéarité de la hauteur du palier ($< 20 \mu\text{M}$). La détermination des paramètres de l'interaction aptamère – lysozyme (Tableau 13a) conduit à des valeurs de constante de dissociation ligand-site (k_d) (cf. paragraphe 3.2. de ce chapitre et annexe) très dispersées selon la méthode de linéarisation considérée : $k_d = 754 \pm 223 \mu\text{M}$, soit une valeur supérieure de deux ordres de grandeur aux valeurs déterminées précédemment par électrophorèse capillaire d'affinité ($K_d = 1,2 \pm 0,7 \mu\text{M}$) et supérieure de quatre ordres de grandeurs à celle reportée dans la littérature (31 nM), à laquelle s'ajoute une précision relativement faible. Le nombre de sites affins sur le lysozyme, n , est estimé à $0,46 \pm 0,01$.

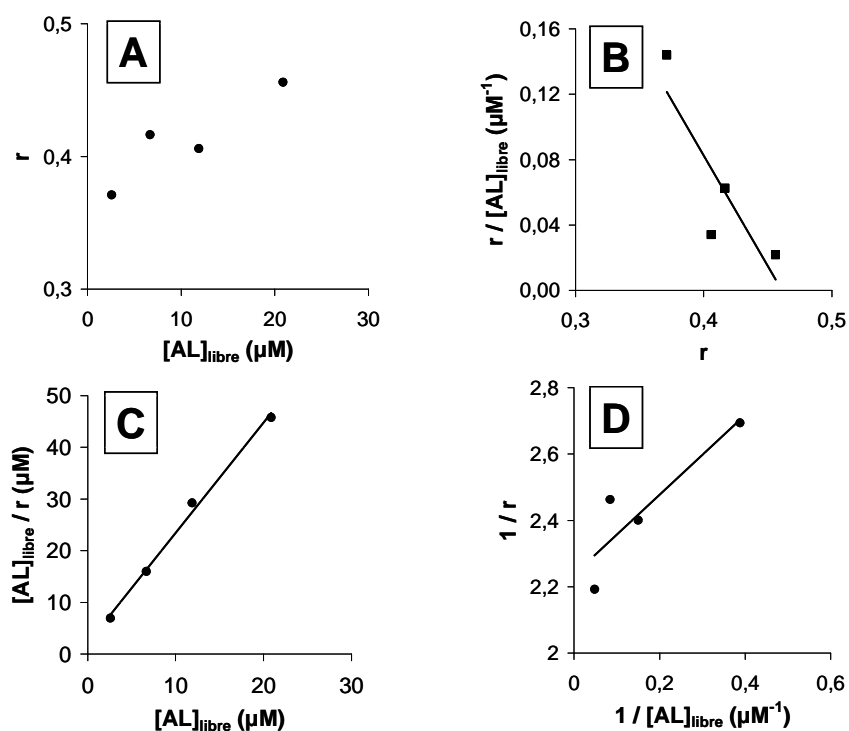


Figure 37 : représentation des données expérimentales obtenues pour la détermination de l'interaction aptamère – lysozyme par analyse frontale (cas de l'aptamère variable) sous les formes de l'isotherme (A), x-réciproque (B), y-réciproque (C) et double réciproque (D). Equations des droites de régression linéaire ($n = 4$) : (B) $y = -1,3509x + 0,6228$ ($R^2 = 0,8151$) ; (C) $y = 2,1331x + 2,0984$ ($R^2 = 0,9997$) ; (D) $y = 1,2033x + 2,2361$ ($R^2 = 0,8643$). Conditions : cf. Figure 36.

2.2.1.2. En présence de magnésium dans l'électrolyte de séparation

Une série d'expériences similaires a été menée en ajoutant du magnésium (MgCl_2 10 mM) dans l'électrolyte. La détermination des paramètres de l'interaction (Tableau 13b)

conduit à un nombre de sites sur le lysozyme similaire à celui obtenu en l'absence de magnésium ($n = 0,45 \pm 0,1$) et à une constante de dissociation légèrement plus faible ($k_d = 355 \pm 120 \mu\text{M}$), mais toujours peu précise et très élevée par rapport aux valeurs attendues. L'ajout de MgCl_2 semble indiquer une augmentation de l'affinité entre le lysozyme et l'aptamère, peut-être dû à un changement de conformation, mais les valeurs de K_d restent toujours trop élevées.

Tableau 13 : équation des droites et paramètres d'interaction obtenus via les différentes méthodes de linéarisation pour l'interaction aptamère – lysozyme en mode FACCE (cas de l'aptamère variable) en absence (a) ou en présence (b) de magnésium dans l'électrolyte.

Méthodes	(a) Sans MgCl_2					(b) Avec MgCl_2 10 mM				
	a	b	R^2	n	k_d (nM)	a	b	R^2	n	k_d (nM)
x-réc	-1,3509	0,6228	0,8151	0,46	740	-2,1910	0,9933	0,8784	0,45	456
y-réc	2,1331	2,0984	0,9997	0,47	984	2,2795	0,5084	0,9993	0,44	223
d-réc	1,2033	2,2361	0,8643	0,45	538	0,8592	2,2321	0,8500	0,45	385
Moyenne				0,46±0,01	754±223				0,45±0,01	355±120

2.2.2. Injection de mélanges contenant une concentration constante en aptamère et une concentration variable de lysozyme

2.2.2.1. En l'absence de magnésium dans l'électrolyte de séparation

Des mélanges aptamère-lysozyme, de concentration constante en aptamère (20 μM) et de concentrations variables, réparties en 8 niveaux, en lysozyme (1-70 μM) ont été préparés dans l'électrolyte MOPS/NaOH 30 mM (pH 7,0) puis analysés par électrophorèse capillaire en mode FACCE. Les électrophérogrammes obtenus se composent d'un front de migration prolongé d'un palier de concentration horizontal, attribué à l'aptamère libre présent dans le mélange, dont la hauteur diminue lorsque la proportion de lysozyme augmente (Figure 38).

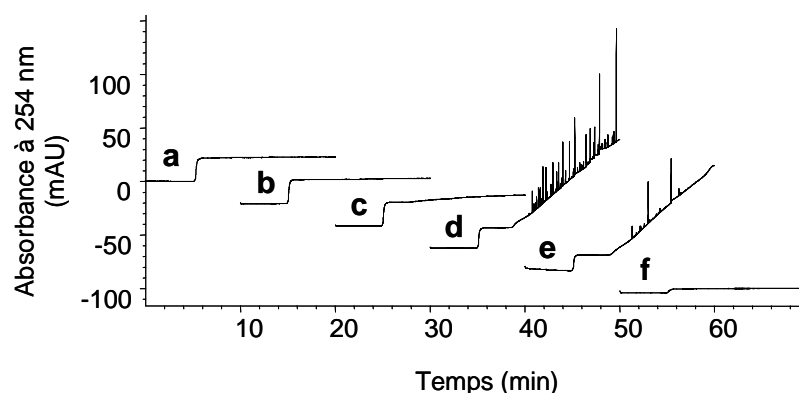


Figure 38 : électrophérogrammes obtenus par injection en mode FACCE de mélanges aptamère 20 μM - lysozyme 0 (a), 1 (b), 2 (c), 10 (d), 20 (e) et 50 μM (f). Capillaire modifié HPC : 50 μm de diamètre interne, 35 cm de longueur totale (détection 26,5 cm). Echantillon : mélange aptamère anti-lysozyme 20 μM + lysozyme 0 – 70 μM , incubé dans l'électrolyte de séparation. Electrolyte de séparation : MOPS/NaOH 30 mM (pH 7,0). Injection électrocinétique continue. Tension appliquée : -10 kV. Température : 25°C. Détection UV : 254 nm

La concentration en aptamère libre, située dans la gamme de linéarité (0 – 20 μM), est déduite de la hauteur du palier en utilisant la droite d'étalonnage établie précédemment (Figure 34A). Les données expérimentales ont été exploitées en faisant jouer au lysozyme le rôle de substrat et à l'aptamère celui de ligand. La concentration en ligand (aptamère) étant constante, la détermination des paramètres de l'interaction est basée sur l'évolution de la concentration en substrat (lysozyme) libre. Celle-ci n'étant pas directement accessible, elle doit d'abord être déterminée via une estimation directe des paramètres d'interaction (optimisation de n de façon à minimiser l'écart-type sur les constantes calculées pour chaque composition du système). L'isotherme d'adsorption (Figure 39A) et ses formes linéarisées (x-réciproque ou représentation de Scatchard, y-réciproque et double-réciproque) (Figure 39B-D) sont ensuite obtenues via les équations établies dans l'annexe.

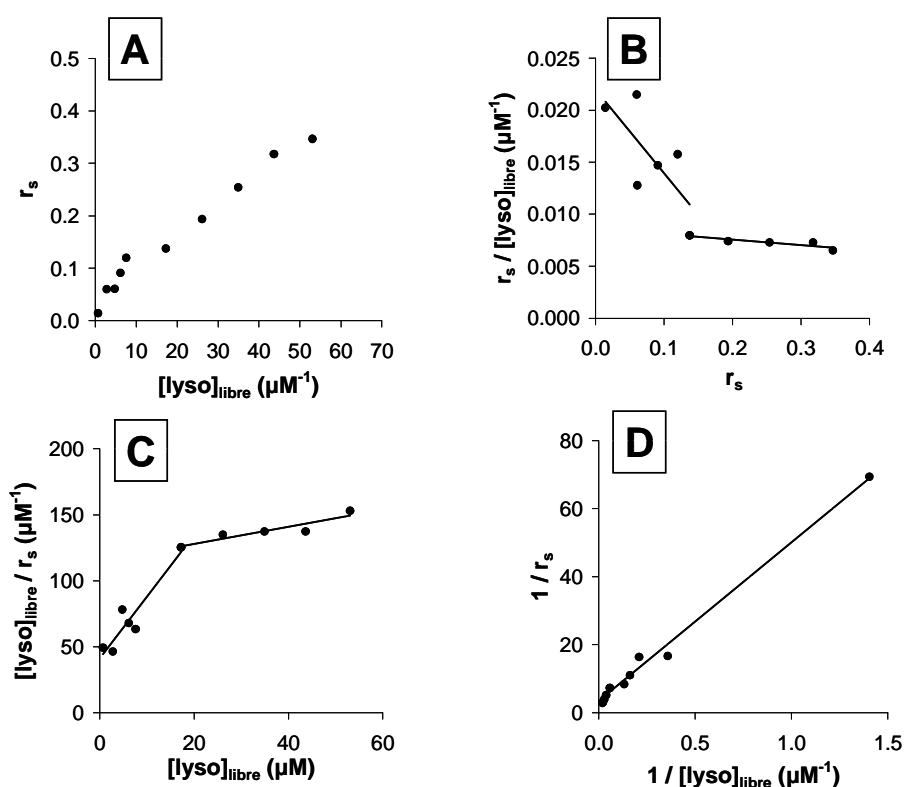


Figure 39 : représentation des données expérimentales obtenues pour la détermination de l'interaction aptamère – lysozyme par analyse frontale (cas de l'aptamère constant) sous les formes de l'isotherme (A), x-réciproque (B), y-réciproque (C) et double réciproque (D). Conditions : cf. Figure 38.

Ces différentes méthodes de linéarisation permettent d'estimer les paramètres de l'interaction aptamère – lysozyme (Tableau 14). La constante de dissociation (k_d) obtenue ($23,3 \pm 6,6 \mu\text{M}$) est supérieure d'un ordre de grandeur aux valeurs déterminées précédemment par électrophorèse capillaire d'affinité ($K_d = 1,2 \pm 0,7 \mu\text{M}$) et supérieure de trois ordres de grandeurs à celle reportée dans la littérature (31 nM). Le nombre de sites sur le lysozyme, n , est de $0,42 \pm 0,08$.

Tableau 14 : détermination des paramètres de l'interaction aptamère – lysozyme par les méthodes de linéarisation et le calcul direct. Conditions : cf. Figure 38.

	Equation des droites	k_d (μM)	n (Apt/lyso)	% de sites
Calcul direct	-	$k_{d1} : 69,2 \pm 3,9$ $k_{d2} : 10,3 \pm 1,3$	$n_1 : 0,42$ $n_2 : 1,83$	-
Linéarisation Lyso 1 – 70 μM	x-réc : $y = -0,0407x + 0,0182$ ($R^2 = 0,6829$) y-réc : $y = 2,0788x + 60,6870$ ($R^2 = 0,8392$) d-réc : $y = 48,4630x + 3,0082$ ($R^2 = 0,9922$)	$23,3 \pm 6,6$	$0,42 \pm 0,08$	-
Linéarisation Lyso 1 – 20 μM	x-réc : $y = -0,0794x + 0,0214$ ($R^2 = 0,5285$) y-réc : $y = 4,7487x + 42,4100$ ($R^2 = 0,8797$) d-réc : $y = 47,9320x + 3,5201$ ($R^2 = 0,9912$)	$11,7 \pm 2,5$	$0,25 \pm 0,04$	93
Linéarisation Lyso 20 – 70 μM	x-réc : $y = -0,0053x + 0,0084$ ($R^2 = 0,7904$) y-réc : $y = 0,6640x + 117,5100$ ($R^2 = 0,8523$) d-réc : $y = 117,5600x + 0,6640$ ($R^2 = 0,9997$)	$180,9 \pm 6,7$	$1,53 \pm 0,05$	7

Dans la gamme de concentration en lysozyme étudiée, la représentation de Scatchard se compose de deux segments de droites (Figure 39B). Ce phénomène se retrouve, dans une moindre mesure, sur les représentations y-réciproque et double-réciproque. La détermination des paramètres des deux segments de droite conduit aux valeurs suivantes (Tableau 14) :

$$k_{d1} = 11,7 \pm 2,5 \mu\text{M} \quad n_1 = 0,25 \pm 0,04 \quad (1 < [\text{lyso}] < 20 \mu\text{M} \text{ soit } 1 < r = \text{Apt/Lyso} < 20)$$

$$k_{d2} = 180,9 \pm 6,7 \mu\text{M} \quad n_2 = 1,53 \pm 0,05 \quad (20 < [\text{lyso}] < 70 \mu\text{M} \text{ soit } 0,3 < r = \text{Apt/Lyso} < 1)$$

Ces résultats traduisent une tendance du lysozyme à se lier à l'aptamère par l'intermédiaire de deux classes de sites d'affinités différentes, ce qui semblerait correspondre à un mécanisme anticoopératif ($k_{d1} < k_{d2}$). La proportion relative de chacun des sites peut être déterminée en calculant la contribution relative de leur k_d au k_d global. Il résulte ainsi qu'il existe environ 7% de sites de faible affinité et environ 93% de sites d'affinité plus élevée.

Trois autres séries d'expériences identiques ont conduit à des résultats similaires (Tableau 15), démontrant la répétabilité de la méthode développée.

Tableau 15 : constante de dissociation (k_d) et nombre de sites sur le lysozyme obtenus lors des trois séries d'expérience en FACCE par estimation directe ($1 < [\text{lyso}] < 20 \mu\text{M}$).

Série d'expériences	k_{d1} (μM)	n_1
1 (90113)	$69,2 \pm 3,9$	0,42
2 (90108)	$61,3 \pm 0,8$	0,36
3 (90115)	$65,4 \pm 1,0$	0,40
4 (90115)	$61,7 \pm 1,5$	0,37
Moyenne	$64,4 \pm 3,7$	$0,39 \pm 0,03$

2.2.2.2. En présence de magnésium dans l'électrolyte de séparation

Une série d'expériences similaires a été menée en ajoutant du magnésium (MgCl_2 10 mM) dans l'électrolyte. L'isotherme d'adsorption et ses formes linéarisées sont représentées sur la Figure 40.

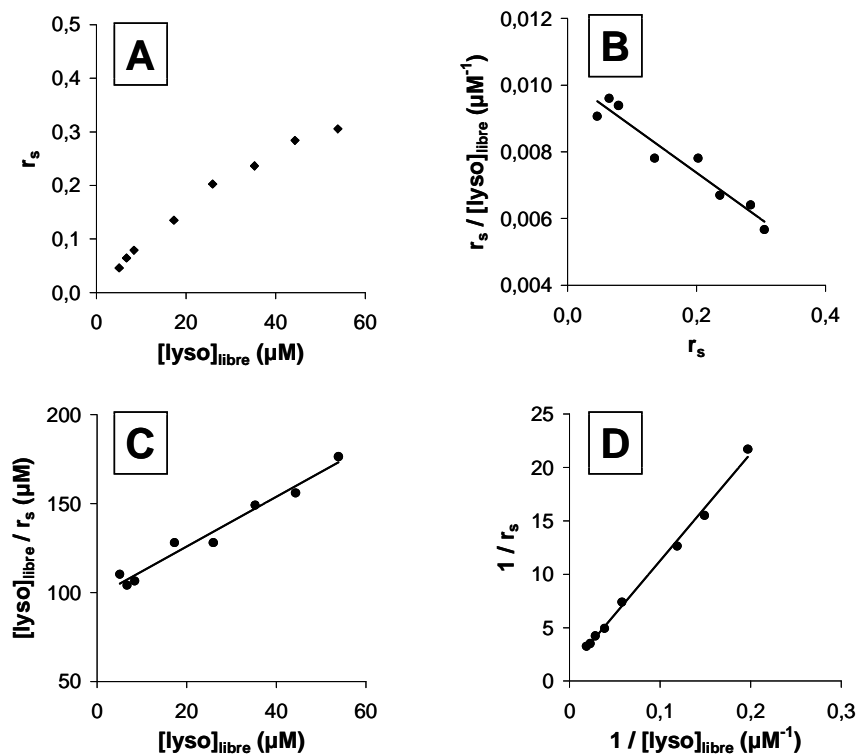


Figure 40 : représentation des données expérimentales obtenues pour la détermination de l'interaction aptamère – lysozyme en présence de magnésium par analyse frontale (cas de l'aptamère constant) sous les formes de l'isotherme (A), x-réciproque (B), y-réciproque (C) et double réciproque (D). Conditions : cf. Figure 38, sauf électrolyte de séparation : MOPS/NaOH 30 mM (pH 7,0) + MgCl_2 10 mM.

Contrairement à ce qui a été observé en l'absence de magnésium dans l'électrolyte de séparation, les représentations graphiques obtenues présentent une linéarité acceptable. Le Tableau 16 regroupe les équations des droites et les paramètres d'interaction obtenus via les différentes méthodes de linéarisation. La constante de dissociation ($k_d = 74,1 \pm 7,0 \mu\text{M}$) est du même ordre que celle obtenue en l'absence de magnésium, tandis que le nombre de sites sur le lysozyme présente une valeur légèrement plus élevée ($n = 0,75 \pm 0,04$).

Tableau 16 : équation des droites et paramètres d'interaction obtenus via les différentes méthodes de linéarisation pour l'interaction aptamère – lysozyme en mode FACCE (cas de l'aptamère constant) en présence de magnésium dans l'électrolyte.

Méthodes	a	b	R^2	n	k_d (μM)
x-réc	-0,0139	0,0102	0,9337	0,73	71,9
y-réc	1,3953	98,0150	0,9687	0,72	70,2
d-réc	100,2800	1,2535	0,9955	0,80	80,0
Moyenne				$0,75 \pm 0,04$	$74,1 \pm 7,0$

3. Conclusion

L'étude de l'interaction entre l'aptamère anti-lysozyme et sa cible par électrophorèse capillaire par ACE et FACCE) avec détection UV a abouti à des constantes d'affinités de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-5} M respectivement, supérieures de plusieurs ordres de grandeurs aux valeurs attendues. Il semble donc que la faible sensibilité de la détection UV ne permette pas de visualiser l'interaction spécifique entre l'aptamère et sa cible, mais uniquement des interactions non-spécifiques, d'affinité plus faible. Afin d'appuyer cette hypothèse, l'interaction entre le lysozyme et un aptamère non spécifique (l'aptamère anti-thrombine) a été étudiée par FACCE, et a conduit à l'obtention d'une constante de dissociation du même ordre que celle observée lors de l'interaction avec l'aptamère spécifique ($k_d \sim 50 \mu\text{M}$) : il s'agit donc vraisemblablement d'une interaction de type électrostatique entre l'aptamère chargé négativement et le lysozyme chargé positivement à pH neutre.

Afin de visualiser l'interaction spécifique entre l'aptamère anti-lysozyme et sa cible, un mode de détection plus sensible devra donc être mis en œuvre, tel que la détection de fluorescence, impliquant le marquage de l'un des deux partenaires par un fluorophore.

[1] Williams, B. A., Vigh, G., *Anal. Chem.* 1996, 68, 1174-1180

[2] Girardot, M., Gareil, P., Varenne, A., *Electrophoresis* 2010, 31, 546-555

Annexe 5

Détermination des paramètres d'interaction non-covalente en solution par électrophorèse capillaire

1. Introduction

Plusieurs méthodes de détermination de paramètres d'interaction non-covalente ont été décrites en électrophorèse capillaire. Parmi ces méthodes, on distingue celles basées sur l'électrophorèse de zone, pour lesquelles de faibles volumes d'échantillon sont injectés, et les méthodes basées sur l'analyse frontale électrocinétique, nécessitant l'injection de volumes plus importants. Parmi les méthodes basées sur l'électrophorèse de zone, on distingue :

- la méthode par injection directe (DI) du mélange des deux partenaires de l'interaction, également appelée électrophorèse capillaire hors équilibre de mélanges équilibrés (NECEEM) [1], qui quantifie directement les formes complexée et libre ;
- les méthodes basées sur la variation de la mobilité électrophorétique du substrat (électrophorèse capillaire d'affinité, ACE [2, 3]) ou du ligand (électrophorèse capillaire d'affinité et de vacance, VACE [4]) engendrée par la variation de la concentration en ligand dans l'électrolyte de séparation ;
- les méthodes fondées sur la détermination des aires de pics de vacance telles que la méthode Hümmel-Dreyer (HD) [5].

Dans cette annexe, nous détaillerons le principe des méthodes électrophorétiques de détermination de paramètres d'interaction employées dans le cadre des travaux de thèse présentés (ACE et FACCE) ainsi que les traitements mathématiques permettant d'accéder aux paramètres d'interaction.

2. Détermination de paramètres d'interaction par électrophorèse capillaire d'affinité (ACE)

2.1. Principe de l'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE)

L'électrophorèse capillaire d'affinité (*Affinity Capillary electrophoresis*, ACE) consiste à injecter une courte zone de l'un des partenaires (généralement le substrat) dans un électrolyte de séparation contenant une concentration croissante de l'autre partenaire (généralement le ligand). La complexation avec le ligand entraîne une variation du rapport charge/taille et donc de la mobilité électrophorétique du substrat. Un exemple typique d'évolution du profil électrophorétique est présenté Figure 41. Cette variation de mobilité peut ensuite être reliée à la constante d'interaction, à la mobilité du complexe formé et à la concentration en ligand libre dans la zone de substrat. Cette dernière n'étant pas connue, elle est en général assimilée à la concentration en ligand libre totale. Il n'est en particulier pas nécessaire de connaître avec précision la concentration du substrat injecté, ce qui constitue l'un des avantages majeurs de cette méthode, notamment dans le cas des protéines. La simplicité de sa mise en œuvre et de l'accès aux données expérimentales font de l'électrophorèse capillaire d'affinité l'une des méthodes de détermination de constantes les plus utilisées.

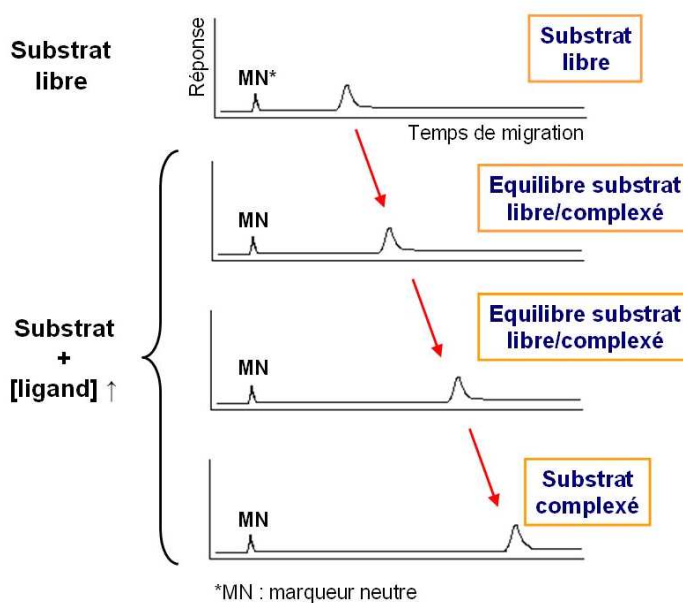


Figure 41 : électrophérogrammes-types obtenus lors de la mise en œuvre de l'électrophorèse capillaire d'affinité

2.2. Détermination des paramètres d'interaction dans le cas d'une interaction monomoléculaire

2.2.1. Isotherme d'adsorption et formes linéarisées

La constante de formation K_f associée à un équilibre de complexation de stoechiométrie 1:1 peut s'écrire (Equation 1) :

$$K_f = \frac{[C]}{[S][L]} \quad (1)$$

où [C], [S] et [L] sont respectivement les concentrations à l'équilibre du complexe, du substrat libre et du ligand libre.

Lorsque le substrat est injecté dans l'électrolyte de séparation contenant le ligand, la mobilité électrophorétique effective μ_s^{eff} du substrat en équilibre avec le ligand est la moyenne des mobilités absolues des formes libre (μ_s°) et liée (μ_c°) du substrat, pondérées par leur fraction molaire (Equation 2) :

$$\mu_s^{eff} = \frac{[S]}{[C]+[S]}\mu_s^\circ + \frac{[C]}{[C]+[S]}\mu_c^\circ \quad (2)$$

L'introduction de l'Equation 1 dans l'expression précédente conduit alors à l'isotherme d'adsorption (Equation 3) :

$$\mu_s^{eff} = \frac{1}{1+K_f[L]}\mu_s^\circ + \frac{K_f[L]}{1+K_f[L]}\mu_c^\circ \quad (3)$$

Des méthodes de linéarisation mathématique de l'isotherme d'adsorption permettent ensuite d'accéder aux paramètres de l'interaction (Tableau 17). Outre la constante d'interaction K_f , les méthodes x-réciproque, y-réciproque et double-réciproque fournissent la mobilité absolue du complexe μ_c° , tandis que la méthode de l'isotherme nécessite la détermination préalable de la valeur de μ_s° . Une bonne estimation de cette dernière peut être obtenue par mesure de la mobilité effective limite du substrat en présence d'une concentration en ligand élevée.

Afin d'obtenir des corrélations linéaires satisfaisantes, ces méthodes requièrent une différence significative entre les mobilités des formes libre et liée du substrat. Bien que les formes algébriques de ces quatre équations soient équivalentes, la précision expérimentale des variables possède un impact différent suivant si elles sont présentes au numérateur ou au dénominateur. Par exemple, les méthodes x-réciproque et double-réciproque, qui font apparaître la variable $1/[L]$, donnent plus de poids statistique aux données correspondant aux

faibles concentrations en ligand, pour lesquelles la précision expérimentale est plus faible [6, 7].

Tableau 17 : formes linéarisées de l'isotherme d'adsorption pour la détermination des paramètres d'interaction en électrophorèse capillaire d'affinité (ACE).

Méthode	Equation ($y = a.x + b$)	K_f	$\mu_c^\circ - \mu_s^\circ$
Isotherme	$\frac{\mu_s^\circ - \mu_s^{eff}}{\mu_s^{eff} - \mu_c^\circ} = K_f [L] = f([L])$	a	$Exp.$
x-réciproque	$\frac{\mu_s^{eff} - \mu_s^\circ}{[L]} = K_f (\mu_s^{eff} - \mu_s^\circ) + K_f (\mu_c^\circ - \mu_s^\circ) = f(\mu_s^{eff} - \mu_s^\circ)$	$-a$	$\frac{b}{a}$
y-réciproque	$\frac{[L]}{\mu_s^{eff} - \mu_s^\circ} = -\frac{[L]}{\mu_c^\circ - \mu_s^\circ} + \frac{1}{K_f (\mu_c^\circ - \mu_s^\circ)} = f([L])$	$\frac{a}{b}$	$\frac{1}{a}$
Double-réciproque	$\frac{1}{\mu_s^{eff} - \mu_s^\circ} = \frac{1}{K_f (\mu_c^\circ - \mu_s^\circ)} \frac{1}{[L]} + \frac{1}{\mu_c^\circ - \mu_s^\circ} = f\left(\frac{1}{[L]}\right)$	$\frac{b}{a}$	$\frac{1}{b}$

2.2.2. Correction de viscosité

La validité de la méthode implique que la variation de mobilité observée soit due uniquement à la complexation avec le ligand. A mesure que la concentration en ligand dans l'électrolyte augmente, il est donc nécessaire de corriger la variation de mobilité due aux changements de force ionique et de mobilité de l'électrolyte [8]. Dans la majorité des cas, seule la variation de viscosité est considérée, la variation de force ionique pouvant être négligée (ce qui est justifié lorsque le ligand est neutre ou faiblement concentré par rapport à l'électrolyte de séparation). Les mobilités expérimentales sont corrigées par un terme correctif ν (Equation 4) :

$$\nu = \frac{\eta_i}{\eta_0} \quad (4)$$

avec η_i la viscosité de l'électrolyte contenant le ligand au niveau i et η_0 la viscosité de l'électrolyte en l'absence de ligand [9].

2.2.3. Cas des cinétiques lentes

La complexation devant se réaliser dynamiquement au cours de la migration dans le capillaire, l'électrophorèse capillaire d'affinité n'est adaptée que pour l'étude d'interactions

présentant des cinétiques rapides de formation et de dissociation du complexe. Lorsque la dissociation du complexe est lente relativement au temps de migration, c'est-à-dire lorsque le rapport $\ln 2/k_{off}$ (avec k_{off} la constante de vitesse de dissociation) est supérieur à 1% du temps total de migration, le profil électrophorétique du substrat est susceptible d'être déformé (élargissement, traînée, division partielle voire disparition du pic) [10], ce qui peut fausser la détermination des paramètres d'interaction.

2.2.4. Méthodes de remplissage partiel du capillaire

L'un des inconvénients majeurs de l'électrophorèse capillaire d'affinité est la consommation relativement importante de ligand. En effet, celui-ci doit être présent dans le capillaire au moment de l'injection du substrat, puis introduit en continu lors de la migration électrophorétique. Afin de réduire le volume de ligand consommé, des méthodes de remplissage partiel ont été développées [11, 12]. Dans ce cas, le capillaire est rempli initialement par l'électrolyte de séparation, puis un large créneau de ligand est introduit et une courte zone de substrat est injectée. Au cours de la migration électrophorétique, la zone de substrat traverse le créneau de ligand, soit totalement soit en partie. Comme pour l'ACE classique, la variation de la mobilité électrophorétique du substrat observée est corrélée à la concentration en ligand et à la constante d'interaction K_f . Néanmoins, cette méthode nécessite une bonne connaissance préalable du comportement électrophorétique des partenaires de l'interaction, tant sous leur forme libre que complexée, et est généralement assez délicate à mettre en œuvre.

3. Détermination de paramètres d'interaction par analyse frontale électrocinétique continue (FACCE)

3.1. Principe de l'analyse frontale électrocinétique continue (FACCE)

Contrairement aux méthodes de détermination de constantes basées sur l'électrophorèse de zone (telles que l'électrophorèse capillaire d'affinité) pour lesquelles un faible volume d'échantillon est injecté, l'analyse frontale consiste à injecter, dans un capillaire ne contenant que l'électrolyte de séparation, un large volume d'un mélange substrat – ligand

préalablement incubé. De cette façon, l'intégrité de l'équilibre considéré est conservée, les partenaires de l'interaction n'étant que partiellement séparés lors de la migration électrophorétique. Il existe deux variantes de cette méthode, qui diffèrent par le mode d'injection de l'échantillon (hydrodynamique (FACE) ou électrocinétique en continu (FACCE)).

L'analyse frontale électrocinétique continue consiste à injecter continûment un mélange substrat – ligand, préalablement incubé dans l'électrolyte de séparation, par application d'un champ électrique [13]. La migration électrophorétique des constituants du mélange conduit à la formation de fronts de migration séparés selon les mobilités des espèces correspondantes. Lorsque toutes les espèces en solution sont détectées, l'injection du mélange conduit à l'apparition de trois fronts de migration, correspondant au substrat, au ligand et au complexe substrat – ligand formé (Figure 42). Si le ligand possède la mobilité apparente la plus élevée, le premier front marque l'arrivée devant le détecteur du ligand libre seul (L), à sa concentration d'équilibre avec le substrat. Les deux fronts suivants correspondent respectivement au complexe (C) et au substrat libre (S) en équilibre. Ces fronts de migration se prolongent par des paliers de concentration successifs. L'étalonnage de la hauteur du premier palier, réalisé par injection du ligand seul, permet de déterminer la concentration en ligand libre dans le mélange substrat – ligand, et d'en déduire les paramètres de l'interaction via l'écriture des bilans – matière.

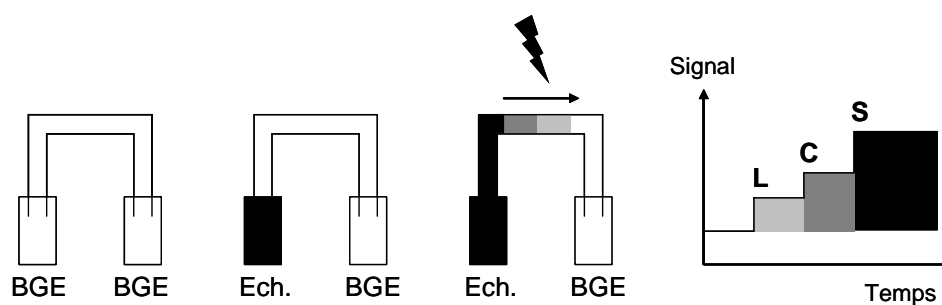


Figure 42 : représentation schématique de la mise en œuvre de l'analyse frontale électrocinétique continue et allure de l'électrophérogramme obtenu. Détection des espèces dans l'ordre des mobilités apparentes décroissantes : L, C et S. Noir : L + S + C ; gris foncé : L + C ; gris clair : L.

3.2. Détermination des paramètres d'interaction

3.2.1. Cas général de l'adsorption de ligands sur un substrat

Considérons l'interaction entre un substrat (S) et un ligand (L) pouvant être décrite par la formation d'un complexe (C) de stoechiométrie 1:n. L'équilibre correspondant peut s'écrire (Equation 5) :



La constante de formation ($K_f = 1/K_d$) est définie comme suit (Equation 6) :

$$K_f = \frac{[C]}{[S][L]^n} \quad (6)$$

où [C], [S] and [L] sont respectivement les concentrations à l'équilibre du complexe, du substrat libre et du ligand libre.

Dans le cas d'un système constitué par deux partenaires dont au moins l'un est de grande dimension moléculaire et susceptible de se coordonner à plusieurs entités du second partenaire, l'espèce possédant le plus grand nombre de sites d'interaction potentiels (correspondant le plus souvent au partenaire de plus grande dimension) est généralement considérée comme le substrat, tandis que le second partenaire, supposé ne présenter qu'un seul mode de liaison, est considéré comme le ligand. Cette situation concerne tout particulièrement les systèmes d'intérêt biologique, tels que l'interaction protéine – petite molécule. Ainsi, à l'exception d'une interaction de stoechiométrie 1:1 correspondant à l'existence d'un site sur chacun des partenaires, les rôles du substrat et du ligand ne sont pas symétriques. En particulier, le nombre de sites n défini dans ce modèle correspond au nombre de sites sur le substrat et non l'inverse.

3.2.2. Modèle multi-sites [6]

Considérons un substrat possédant n sites d'interaction avec le ligand, d'énergies identiques. L'interaction élémentaire entre un ligand L et un site s sur le substrat peut se traduire par l'équilibre monomoléculaire suivant (Equation 7) :



Dans ce modèle, les paramètres d'interaction sont le nombre de sites d'interaction n et la constante d'association ligand-site ou constante intrinsèque $k_f (=1/k_d)$, définie comme suit (Equation 8) :

$$k_f = \frac{[s.L]}{[s][L]} \quad (8)$$

Les équations de conservation de la matière s'écrivent pour ce système (Equations 9 et 10) :

$$[L]_0 = [L] + [s.L] \quad (9)$$

$$[s]_0 = [s] + [s.L] = n[S]_0 \quad (10)$$

où $[L]_0$ et $[s]_0$ sont les concentrations initiales en ligand et en sites, et $[L]$ et $[s]$ les concentrations en ligand et en sites libres à l'équilibre.

Supposons que l'on fasse varier $[L]_0$ pour une concentration initiale en substrat fixée, et que l'on soit capable de déterminer directement la concentration en ligand libre $[L]$. Le taux d'association moyen r du ligand L sur le substrat S , qui permet ensuite d'accéder aux paramètres n et k de l'interaction, est défini par (Equation 11):

$$r = \frac{[L]_0 - [L]}{[S]_0} = n \frac{[s.L]}{[s] + [s.L]} = n \frac{k_f [L]}{1 + k_f [L]} \quad (11)$$

Le graphe $r = f([L])$, d'allure hyperbolique, est appelé isotherme d'adsorption du ligand sur le substrat. Son tracé permet d'accéder aux valeurs de k et n par ajustement non linéaire (Tableau 18a). Cette isotherme peut également être linéarisée afin de déterminer les paramètres d'interaction par régression linéaire. Trois méthodes de linéarisation fondées sur des réarrangements de la relation (11) sont ainsi couramment décrites. L'équation et la détermination de k et n correspondant à chaque méthode sont présentées dans le Tableau 18a. Comme pour l'électrophorèse capillaire d'affinité, le poids statistique attribué aux points expérimentaux diffère selon les méthodes.

Si l'on fait varier $[s]_0$ pour une concentration initiale en ligand fixée, on définit le taux d'association moyen r_s du substrat sur le ligand (Equation 12) :

$$r_s = \frac{[S]_0 - [S]}{[L]_0} = \frac{[s - L]}{n([L] + [s - L])} = \frac{k_f [S]}{1 + nk_f [S]} \quad (12)$$

Les paramètres d'interaction peuvent alors être déterminés à partir de la concentration en substrat libre $[S]$ via des méthodes d'ajustement linéaire et de linéarisation très similaires à celles décrites précédemment (Tableau 18b). Si la concentration en substrat libre n'est pas accessible expérimentalement, elle doit être déduite à partir de la concentration en ligand libre. La stoechiométrie de la complexation n'étant pas connue a priori, une estimation directe doit être réalisée dans un premier temps. La constante de formation est calculée pour chaque système de composition chimique fixée, à partir de (Equation 13) :

$$k_f = \frac{[L]_0 - [L]}{[L] \times (n[S]_0 - [L]_0 + [L])} \quad (13)$$

La valeur de n est optimisée de façon à minimiser la dispersion sur les valeurs de k_f obtenues pour les systèmes chimiques de composition différente étudiés, et $[S]$ est calculé à l'aide du bilan matière suivant (Equation 14):

$$[S] = [S]_0 - [C] = [S]_0 - \frac{[L]_0 - [L]}{n} \quad (14)$$

Tableau 18 : isotherme d'adsorption et ses formes linéarisées pour la détermination de la constante d'interaction k_f et du nombre de sites n sur le substrat en analyse frontale

	Méthode	Equation ($y = a.x + b$)	k_f	n
(a) Ligand variable, substrat constant	Isotherme d'adsorption	$r = f([L])$	<i>Pente de la tangente à l'origine</i>	<i>Ordonnée de l'asymptote horizontale</i>
	x-réciproque (représentation de Scatchard)	$\frac{r}{[L]} = nk_f - rk_f$	$-a$	$-\frac{b}{a}$
	y-réciproque	$\frac{[L]}{r} = \frac{1}{nk_f} + \frac{[L]}{n}$	$\frac{a}{b}$	$\frac{1}{a}$
	Double-réciproque	$\frac{1}{r} = \frac{1}{nk_f[L]} + \frac{1}{n}$	$\frac{b}{a}$	$\frac{1}{b}$
(b) Substrat variable, ligand constant	Isotherme d'adsorption	$r_s = f([S])$	<i>Pente de la tangente à l'origine</i>	<i>Ordonnée de l'asymptote horizontale</i>
	x-réciproque (représentation de Scatchard)	$\frac{r}{[S]} = k_f - nk_f r_s$	$-b$	$-a/b$
	y-réciproque	$\frac{[S]}{r_s} = \frac{1}{k_f} + n[S]$	$\frac{1}{b}$	a
	Double-réciproque	$\frac{1}{r_s} = \frac{1}{k_f[S]} + n$	$\frac{1}{a}$	b

Références bibliographiques

- [1] Berezovski, M., Drabovich, A., Krylova, S. M., Musheev, M., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, *127*, 3165-3171.
- [2] Shimura, K., Kasai, K.-i., *Anal. Biochem.* 1997, *251*, 1-16.
- [3] Varenne, A., Gareil, P., Collic-Jouault, S., Daniel, R., *Anal. Biochem.* 2003, *315*, 152-159.
- [4] Busch, M. H. A., Boelens, H. F. M., Kraak, J. C., Poppe, H., *J. Chromatogr. A* 1997, *775*, 313-326.
- [5] Rudnev, A. V., Aleksenko, S. S., Semenova, O., Hartinger, C. G., *et al.*, *J. Sep. Sci.* 2005, *28*, 121-127.
- [6] Connors, K. A., *Binding constants. The measurements of molecular complex stability.*, John Wiley & Sons, New York 1987.
- [7] Rundlett, K. L., Armstrong, P. D. W., *Electrophoresis* 1997, *18*, 2194-2202.
- [8] Britz-McKibbin, P., Chen, D. D. Y., *Electrophoresis* 2002, *23*, 880-888.
- [9] Tanaka, Y., Terabe, S., *J. Chromatogr. B* 2002, *768*, 81-92.
- [10] Heegaard, N. H. H., Kennedy, R. T., *Electrophoresis* 1999, *20*, 3122-3133.
- [11] Heintz, J., Hernandez, M., Gomez, F. A., *J. Chromatogr. A* 1999, *840*, 261-268.
- [12] Kaddis, J., Mito, E., Heintz, J., Plazas, A., Gomez, F. A., *Electrophoresis* 2003, *24*, 1105-1110.
- [13] Gao, J. Y., Dubin, P. L., Muhoberac, B. B., *Anal. Chem.* 1997, *69*, 2945-2951.

Annexe 6

Composition des différents électrolytes de séparation utilisés

Les tableaux suivants fournissent la force ionique, le pH et la composition des différents électrolytes décrits dans ce manuscrit.

Acétate de sodium

Force ionique (mM)	pH	Acide acétique (mM)	Acétate de sodium (mM)
30	5,0	14,44	29,99

Bis-Tris/HCl

Force ionique (mM)	pH	Bis-Tris (mM)	HCl (mM)
30	5,7	34,01	30,00
	6,2	42,68	30,00

Borate de sodium

Force ionique (mM)	pH	Acide borique (mM)	Borate de sodium (mM)
9	9,2	8,67	9,00
20	9,5	9,34	20,00

Formiate d'ammonium

Force ionique (mM)	pH	Formiate d'ammonium (mM)	Ammoniac (mM)
10	8,9	9,99	59,29
	9,8	9,92	470,96
30	9,1	29,98	267,50
	10,0	29,67	2239,26

Formiate de sodium

Force ionique (mM)	pH	Acide formique (mM)	Formiate de sodium (mM)
30	3,3	30,00	53,35

MES/NaOH

Force ionique (mM)	pH	MES (mM)	NaOH (mM)
30	6,0	64,14	30,00
	6,2	51,54	30,00
	6,4	43,59	30,00

MOPS/NaOH

Force ionique (mM)	pH	MOPS (mM)	NaOH (mM)
10	7,4	15,61	10,00
30	7,0	70,11	30,00
	7,4	45,97	30,00
50	7,4	75,56	50,00
100	7,4	149,53	100,00

Phosphate de sodium

Force ionique (mM)	pH	NaH ₂ PO ₄ (mM)	Na ₂ HPO ₄ (mM)
30	7,0	7,60	7,20
	7,2	8,34	4,98
50	7,0	13,02	10,93
75	7,0	19,68	15,97
100	7,0	26,57	20,28

Tris/HCl

Force ionique (mM)	pH	Tris (mM)	HCl (mM)
30	8,1	56,75	30,00