



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

**Discipline ou spécialité**

*Biologie Structurale et Fonctionnelle*

---

**Présentée et soutenue par**

Olivier MARTINEZ

**Le** 18 décembre 2013

**Titre :**

*Aptamères ADN : du Cell-SELEX à l'imagerie*

---

**JURY**

*François COUDERC, Professeur, IMRCP, Toulouse*

*Carmelo DIPRIMO, Chargé de Recherche, IECB, Bordeaux*

*Frédéric DUCONGE, Chargé de Recherche, CEA, Orsay*

*Jean-Louis MARTY, Professeur, Images, Perpignan*

*Vincent ECOCHARD, Chargé de Recherche, IPBS, Toulouse*

*Laurent PAQUEREAU, Professeur, IPBS, Toulouse*

*Président*

*Rapporteur*

*Rapporteur*

*Examineur*

*Directeur de thèse*

*Directeur de thèse*

---

**Ecole doctorale :** *Biologie-Santé, Biotechnologies*

**Unité de recherche :** *Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS, UMR5089*



## Table des matières

Introduction.....	9
1 Cancer Epithélial Ovarien.....	10
1.1 Marqueur tumoral CA 125.....	13
1.2 Traitement anti-angiogénique.....	16
2 Les Aptamères.....	17
3 Les Avantages des Aptamères.....	18
4 Le SELEX.....	21
5 Les Librairies.....	27
6 Les Molécules Cibles.....	32
7 Processus de Sélection.....	38
7.1 Liaison à la cible.....	38
7.2 Partitionnement.....	39
7.3 Amplification.....	41
7.4 Génération de la sous-librairie d'ADN simple-brin.....	42
7.4.1 PCR asymétrique :.....	44
7.4.2 Single-Primer Limited Amplification (SPLA) :.....	44
7.4.3 Brins de longueur inégale :.....	44
7.4.4 Digestions par des exonucléases :.....	45
7.4.5 Séparation Biotine-Streptavidine :.....	46
7.4.6 Comparaison des méthodes :.....	46
8 Suivi de l'Evolution du SELEX.....	48
8.1 Dosage de fluorescence :.....	48
8.2 Chromatographie liquide de haute-performance en condition dénaturante (dHPLC) :.....	49
8.3 Analyse des températures de renaturation.....	49

8.4	Analyse du polymorphisme par la longueur de fragments de restriction (RFLP) : .....	49
9	Identification des Séquences.....	50
9.1	Clonage – séquençage .....	50
9.2	Séquençage haut-débit Illumina.....	51
10	Analyse des Populations de Séquences .....	54
10.1	Approche classique .....	54
10.2	Approche haut-débit.....	55
10.2.1	Identification par le taux d'enrichissement :.....	55
10.2.2	Classification par polymorphisme en clusters :.....	55
10.2.3	Classification structurale en clusters :.....	56
10.2.4	Identification acyclique d'aptamères :.....	56
10.2.5	Identification par analyse des k-mer :.....	57
11	Caractérisation et Optimisation des Aptamères .....	58
11.1	Caractérisation : .....	58
11.2	Optimisation des aptamères identifiés :.....	60
11.2.1	Etudes de tronquage : .....	60
11.2.2	Modifications chimiques pour applications.....	61
12	Les Aptamères comme Outils Thérapeutiques et Diagnostiques .....	62
12.1	La thérapie .....	62
12.2	Diagnostic <i>in vitro</i> .....	64
12.3	Diagnostic par imagerie.....	65
13	Objectifs .....	83
	Résultats.....	85
1	Problématique de Purification du Simple Brin à partir des Banques ADN .....	86
1.1	« $\alpha,\beta$ -D-constrained nucleic acids are strong terminators of thermo-stable DNA polymerases in polymerase chain reaction », article publié dans le journal PLoSOne en 2011. ....	86

1.2	Données non publiées sur la contrainte induite par 2 modifications terminatrices de polymérisation espacées dans la matrice .....	97
2	SELEX IL-8.....	100
2.1	Non-SELEX par électrophorèse capillaire .....	101
2.1.1	Sélection .....	101
2.1.2	Clonage .....	103
2.1.3	Tests d'affinités .....	105
2.2	Filter-Binding SELEX contre l'IL-8.....	106
2.2.1	Sélection .....	106
2.2.2	Interaction de la sous-librairie du cycle 6 avec la cible IL-8 .....	107
2.2.3	Séquençage haut débit .....	107
2.3	Comparaison des séquences obtenues par les deux approches CE-SELEX et Filter-Binding SELEX .....	109
3	Sélection d'Aptamères Ciblant la Mucine16 : .....	109
3.1	Test d'expression de la Mucine16 sur les lignées cellulaires NIH:OVCAR3 et SK-OV-3.....	110
3.2	Création d'une lignée cellulaire NIH:OVCAR3 Down Mucine16 (Muc16Sh-GFP) .....	111
3.2.1	Contrôle du taux d'expression.....	112
3.2.2	Dilution limite.....	112
3.2.3	Utilisations des cellules NIH:OVCAR3 Down Muc16 .....	113
3.3	Sélection .....	114
3.3.1	La librairie : .....	114
3.3.2	Purification des ADNsb sur colonne streptavidine : .....	115
3.3.3	Conditions de stringence utilisées en SELEX .....	117
3.3.4	Suivi du Cell-SELEX : .....	118
3.4	Clonage.....	124
3.5	Séquençage haut-débit .....	128

3.5.1	Occurrence moyenne des séquences.....	128
3.5.2	Taille des régions dégénérées.....	128
3.5.3	Recherche visuelle de motifs.....	129
3.5.4	Recherche de motifs par MEME.....	131
3.5.5	Evolution des populations de motifs.....	133
3.5.6	Evolution des séquences au sein des populations de motifs.....	134
3.6	Comparaison des résultats de clonage et de séquençage haut-débit.....	139
3.6.1	Représentativité des séquences et évolution des populations.....	139
3.6.2	Diversité de motifs.....	139
3.7	Tests d'affinités sur cellules.....	140
3.7.1	Marquage radioactif sur cellules platées.....	140
3.7.2	Marquage fluorescent sur cellules en suspension.....	143
4	SELEX GFP sur Billes Magnétiques :.....	155
5	Utilisation de l'Aptamère Décrit Anti-Mucine1 :.....	158
	Méthodologie.....	175
1	Lignées Cellulaires :.....	176
2	CE-SELEX IL-8 :.....	176
3	Sélection d'Aptamères par Filter-Binding SELEX :.....	177
4	Sélection d'Aptamères par Cell-SELEX :.....	177
5	PCR en Cascade :.....	179
6	Identification des Séquences :.....	180
6.1	Clonage :.....	180
6.2	Séquençage haut-débit Illumina :.....	181
7	Analyse des Séquences.....	185
7.1	Recherche automatisée de motifs par MEME.....	185
7.2	Recherche manuelle de motifs (faite sur le Cell-selex).....	185
8	Tests d'affinité :.....	187

8.1	Radiomarquage sur cellules platées : .....	187
8.2	Marquage fluorescent en Cytométrie de flux :.....	187
	Conclusion.....	189
1	Purification des ADNsb à partir de Banques ADN :.....	190
2	SELEX contre IL-8 :.....	190
3	Cell-SELEX sur NIH:OVCAR3 :.....	191
4	SELEX contre la GFP :.....	193
5	Utilisation de l'Aptamère Décrit Anti-Mucine1 :.....	194
6	Discussions Générales :.....	194
6.1	Accrochage « non-spécifique » sur cellules : .....	194
6.2	Quel avenir pour le SELEX d'aptamères ?.....	195
6.3	Les acides nucléiques en tant que plateformes : .....	198
	Annexes.....	203
	PyroséquençageRoche454 : .....	204
	Applied Biosystems SOLiD :.....	205
	Références .....	209

## Table des abbréviations

**ADN** : Acide Desoxyribo-Nucléique  
**ARN** : Acide Ribo-Nucléique  
**BET** : Bromure d'Ethydium  
**BSA** : Bovine Serum Albumin  
**CA 125** : Carcinoma Antigen 125  
**CE** : Electrophorèse Capillaire  
**CNA** : Constrained Nucleic Acids  
**Cy5** : Cyanine 5  
**EDTA** : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid  
**EOC** : Epithelial Ovarian Cancer  
**FACS** : Fluorescence Activated Cell Sorting  
**FAM** : 6-Carboxy-Fluorescéine  
**FRET** : Förster Resonance Energy Transfer  
**GFP** : Green Fluorescent Protein  
**LIF** : Light Induced Fluorescence  
**IL-6** : InterLeukine 6  
**IL-8** : InterLeukine 8  
**kDa** : kiloDalton  
**MUC16** : Mucine16  
**nts** : nucléotides  
**PBS** : Phosphate Buffer Saline  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction  
**PEG** : PolyEthylène Glycol  
**PI** : Propidium Iodide  
**Pfu** : Pfu ADN polymerase  
**SELEX** : Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment  
**siRNA** : small-interfering RNA  
**shRNA** : small-hybrid RNA  
**Taq** : Taq ADN polymerase  
**TEG** : TriEthylène Glycol  
**UV** : Ultra-Violet  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor  
**Y** :  $\alpha,\beta$ -D-Constraint Nucleic Acid

# Introduction

---

Cette thèse vise à isoler des aptamères ADN contre plusieurs cibles d'intérêt diagnostique et thérapeutique dans le cadre du cancer épithélial ovarien. Ces aptamères pourront servir d'agents thérapeutiques par l'inhibition de facteurs pro-tumoraux mais également d'outils de ciblage dans le cadre de l'imagerie médicale et de la vectorisation non-virale. La facilité de fonctionnalisation des aptamères et leur bonne pénétration tissulaire les rend particulièrement attractifs pour ces types d'applications.

## **1 Cancer Epithélial Ovarien**

En 2008, 333 000 nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués en France, dont 144 000 cas chez des femmes. Cette même année le cancer de l'ovaire, avec 4 430 nouveaux cas estimés, se situait au septième rang des occurrences de cancers chez la femme (derrière les cancers du sein, du côlon, du poumon, de la thyroïde, de l'endomètre et les lymphomes non hodgkiniens). L'âge médian lors du diagnostic était alors évalué à 65 ans (Haute Autorité de Santé 2010).

Le cancer de l'ovaire est la quatrième cause de décès par cancer chez la femme derrière le cancer du sein, du côlon et du poumon avec plus de 3 000 décès estimés en 2008. Il est donc le second cancer le plus fréquent parmi les cancers gynécologiques. Alors que le taux de survie à 5 ans, tous stades confondus, a significativement évolué pour tous les cancers combinés : 68% pour la population diagnostiquée en 2001 contre 50% dans les années 1970, celui du cancer ovarien a faiblement évolué pour atteindre 47% en 2001 contre 38% dans les années 1970 (Haute Autorité de Santé 2010; Pfisterer & Ledermann 2006).

La vitesse d'évolution des cancers de l'ovaire est mal connue. Certains présentent une longue période de latence clinique propice à un diagnostic précoce. D'autres évoluent rapidement vers une dissémination péritonéale. Le diagnostic peut être établi à un stade précoce en l'absence de symptôme devant une masse découverte dans le cadre d'un suivi gynécologique ou d'une échographie. Mais dans les cas les plus fréquents, le diagnostic est évoqué alors que le cancer est déjà à un

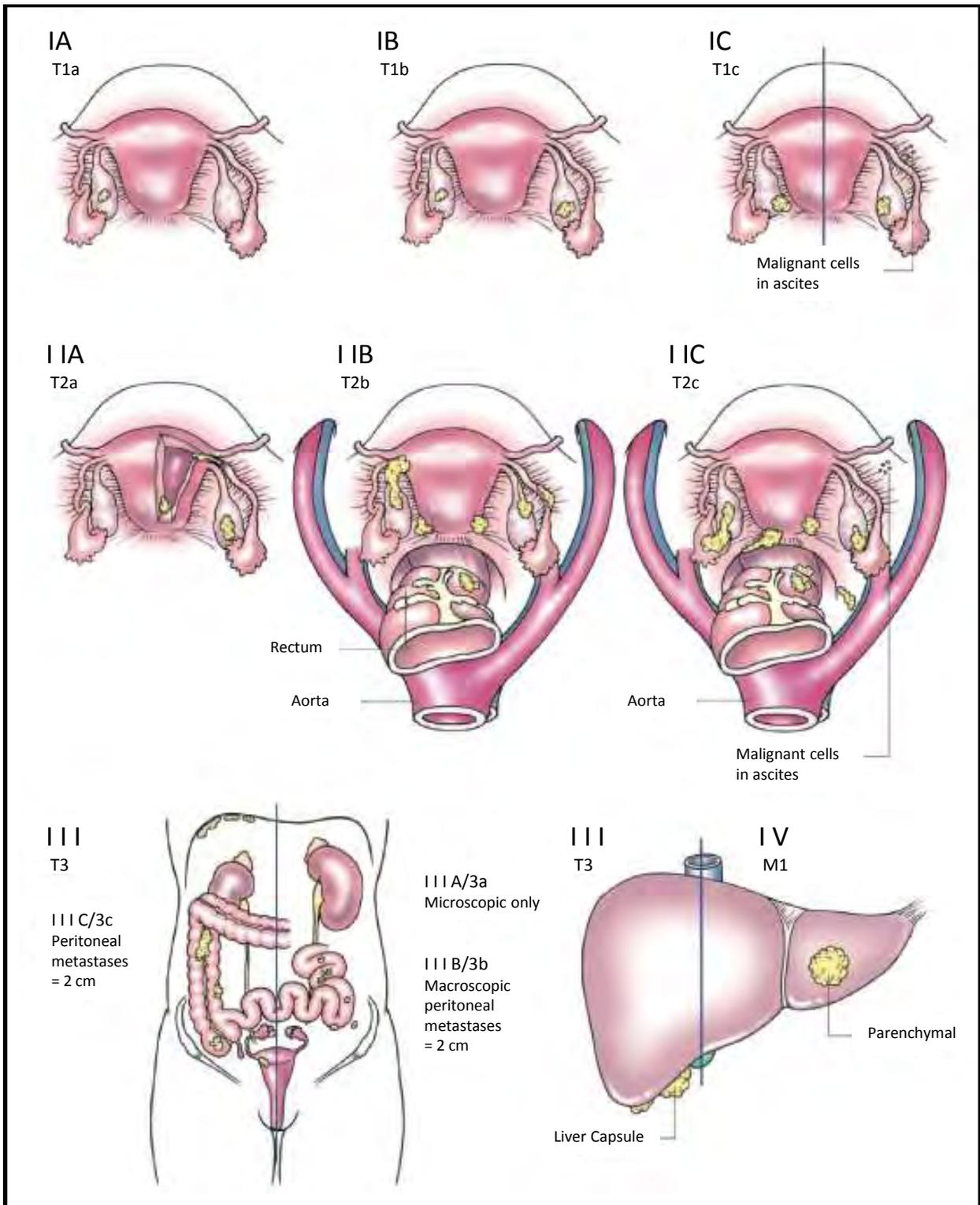
stade avancé. Du fait de la situation anatomique des ovaires, au sein du péritoine, une tumeur ovarienne peut atteindre un volume important avant de provoquer des symptômes qui peuvent être très variés et ne sont jamais spécifiques.

Le diagnostic de ce cancer est anatomopathologique, il se fait après un acte chirurgical et l'analyse du prélèvement histologique. L'examen cytologique seul est insuffisant pour établir le grade et le type histologique du cancer. En cas de carcinose péritonéale, une biopsie sera réalisée sous coelioscopie ou sous contrôle d'imagerie si la coelioscopie est impossible.

L'absence de symptômes précoces retarde la détection de ce type de cancer et les patientes présentent dans 60% des cas un cancer de stades 3 ou 4, avec des foyers secondaires disséminés dans la cavité péritonéale.

Bien que le cancer ovarien puisse survenir à partir de n'importe lequel des types cellulaires de l'ovaire, plus de 90 % des cancers de l'ovaire chez l'adulte sont d'origine épithéliale (adénocarcinomes) (Haute Autorité de Santé 2010). Le cancer épithélial ovarien (EOC epithelial ovarian cancer) se propage par extension directe de la tumeur aux tissus adjacents, et par dissémination des cellules tumorales dans la cavité péritonéale (Cannistra 2004).

Malgré les efforts déployés par de nombreuses équipes afin de pouvoir développer une méthode diagnostique efficace, seulement 20% des cancers ovariens sont détectés à un stade précoce avec un cancer limité aux seuls ovaires (stade 1). La plupart des patientes (80%) sont diagnostiqués à un stade avancé avec des métastases disséminées : sur les organes pelviens (stade 2), l'abdomen (stade 3) et même en dehors du péritoine (stade 4) (Bast et al. 2009). Alors que le taux de survie à cinq ans est proche de 90% pour les patientes en stade 1, de 80% pour les stades 1 et 2 confondus, il est inférieur à 40% pour les stades 3 et 4. Or 70% des patientes sont diagnostiquées tardivement avec des stades 3 ou 4, conduisant à une forte mortalité (Burges & Schmalfeldt 2011). Un diagnostic plus précoce permettrait d'augmenter grandement le taux de survie pour ce type de cancer et il s'agit d'un des axes principaux de la recherche sur le cancer ovarien.



**Figure 1 : Stades d'évolution du cancer épithélial ovarien (EOC). Tumeur primaire et métastases d'après la nomenclature FIGO. (Figure issue de (Heintz & Odicino 2006))**

Actuellement, la thérapie standard de première intention des EOC consiste en un acte chirurgical de cytoréduction maximale combiné à une chimiothérapie à base

de carboplatine et de paclitaxel (Bristow et al. 2002; Bookman et al. 2009). Les patientes répondent bien à la chirurgie et la chimiothérapie dans plus de 80% des cas avec une rémission clinique apparente, mais une rechute macroscopique apparaît chez 75% d'entre elles dans les 5 ans avec une maladie devenue résistante au traitement (Heintz & Odicino 2006; Monk & Coleman 2009). Cette rechute est en partie due à la persistance de foyers péritonéaux suite à la chimiothérapie (maladie résiduelle ou infraclinique). Une fois la rechute survenue, la chimiothérapie a peu d'effet sur les cellules cancéreuses. Ces patientes avec des maladies résistantes aux platines et taxanes sont traitées en seconde intention par d'autres agents comme la doxorubicine liposomale, la gemcitabine, le topopécan ou l'étoposide. L'efficacité de ces traitements reste cependant faible avec 10 à 25% de réponse positive avec une durée limitée (Agarwal & Kaye 2003).

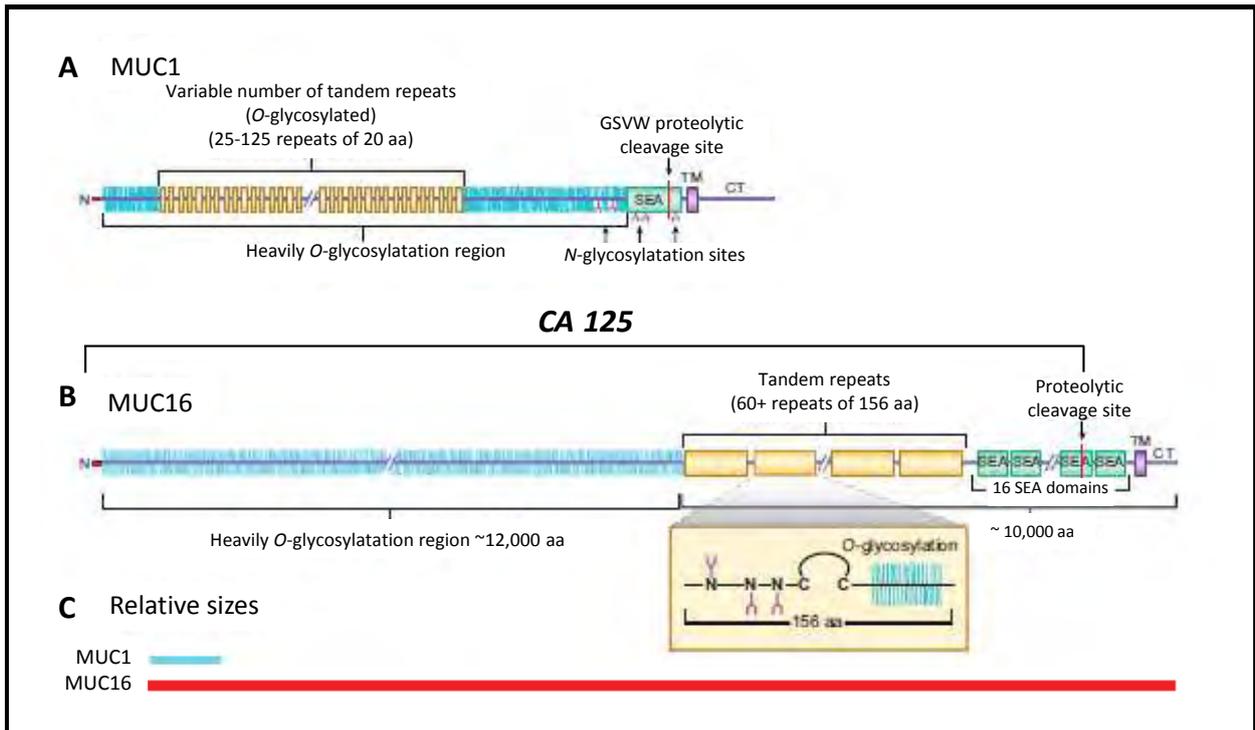
Au cours des 20 dernières années, le taux de survie à 5 ans a été amélioré grâce à un acte chirurgical plus efficace et des traitements combinant différentes drogues cytotoxiques, mais le taux de guérison reste faible avec seulement 30%. La plupart des chercheurs pensent que le développement de nouvelles combinaisons d'agents thérapeutiques conventionnels n'aura qu'un effet limité sur l'amélioration du taux de guérison. Les espoirs se tournent vers le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et vers l'amélioration des traitements existants (par des modes de ciblage moléculaire par exemple), l'amélioration du diagnostic précoce, du suivi et de l'acte chirurgical de cytoréduction (Sato & Itamochi 2012). L'amélioration de la prise en charge de ce type de cancer passe également par le développement d'une méthode très sensible d'évaluation de la progression tumorale (Cannistra 2004; Hanahan & Weinberg 2011).

### **1.1 Marqueur tumoral CA 125**

Très tôt, la protéine Mucine16 a été identifiée comme un antigène membranaire associé à la maladie de par sa surexpression par les cellules épithéliales ovariennes tumorales. Le suivi de la récurrence des EOC est basé sur la détection de la Mucine16 sous sa forme sérique CA 125 (Carcinoma Antigen 125). Il a été démontré par de nombreux groupes que les augmentations et diminutions du taux sérique de CA 125 sont corrélées à une progression et une régression de la maladie (Bast et al. 1983; Canney et al. 1984; Vergote et al. 1987). La Mucine16

surexprimée par les EOC est clivée à la surface des cellules et détectée dans le fluide péritonéal et le sang sous sa forme circulante CA 125. Cette glycoprotéine de haut poids moléculaire constitue donc un bon candidat pour le ciblage des tumeurs, à des fins pharmacologiques ou de visualisation par le chirurgien sous sa forme membranaire. D'autre part, le dosage par un test immuno-fluorescent (Bast et al. 1981; Klug et al. 1984) du CA 125 possède actuellement une sensibilité de 5 UI/mL mais n'est pas suffisante pour détecter des concentrations très faibles de CA 125. Cette limite ne permet pas de déterminer précocement la récurrence et donc rend inefficace l'administration d'une chimiothérapie de deuxième intention. Une amélioration du seuil de détection et le contrôle continu de la cinétique du CA 125 sérique semble prometteur pour la détection préclinique de l'EOC mais également pour un suivi fin de l'évolution du cancer après le traitement de première intention afin de détecter au plus tôt la rechute (Skates et al. 2003).

Même si le CA 125 a été identifiée comme une glycoprotéine de haut poids moléculaire quelques années seulement après l'obtention du premier anticorps monoclonal OC125 (Davis et al. 1986), et sa structure confirmée par des études biochimiques (Lloyd et al. 1997; Lloyd & Yin 2001), il a ensuite fallu attendre 15 ans avant que le gène correspondant à la Mucine16 soit cloné (Yin & Lloyd 2001; O'Brien et al. 2001; Yin et al. 2002). Avec un poids moléculaire supérieur à 2 MDa, la Mucine16 est la plus grosse mucine membranaire connue à ce jour (O'Brien et al. 2001; O'Brien et al. 2002) (**Figure 2**). Cette mégaglycoprotéine est composée de trois domaines principaux : un domaine N-terminal, un domaine central riche en régions répétées (plus de 60 répétitions d'une séquence de 156 acides aminés) et un domaine C-terminal (O'Brien et al. 2001). Le domaine N-terminal et le domaine de répétitions sont fortement O- et N-glycosylés (Kui Wong et al. 2003). Le domaine C-terminal est composé d'un domaine SEA (Seaurchin, Enterokinase, Agrindomain) probablement impliqué dans la protéolyse du CA 125 à la membrane (Palmai-Pallag et al. 2005), d'un domaine transmembranaire pour l'ancrage de la protéine à la membrane cellulaire et d'une courte partie cytoplasmique (31 acides aminés) avec des sites de phosphorylation potentiels. La phosphorylation de la partie cytoplasmique de la Mucine16 est associée à la sécrétion du CA 125 (Fendrick et al. 1997).



**Figure 2 : Structures des Mucine1 et 16.** Les représentations de Muc1 (A) et Muc16 (B) ne sont pas à l'échelle. Les domaines clés incluent la séquence signal N-terminale (rouge) ; les modules de protéine de Sperme, Enterokinase et Agrine (SEA) ; les domaines TransMembranaires (TM) et les queues cytoplasmiques (CT). L'encart en (B) illustre la région répétée en tandem de la Mucine16 qui contient des sites de N-glycosylation, d'O-glycosylation et un pont disulfure entre deux cystéines. La taille relative des deux Mucines est représentée en (C) de manière approximative puisque pouvant varier suivant le nombre de régions répétées en tandem. (Figure adaptée de (Hattrup & Gendler 2008))

Les mucines sont normalement exprimées par les cellules épithéliales et ont pour rôle de les protéger des pathogènes pouvant se fixer aux oligosaccharides. Le fort état de glycosylation des mucines génère un environnement hydrophile idéal pour l'hydratation et la lubrification des épithelia. La Mucine16 est exprimée à des taux basaux dans les épithelia des voies aériennes, à la surface de l'œil pour protéger la cornée et dans les glandes lacrymales. Des études immunohistochimiques avec l'anticorps OC125 ont permis de détecter son expression dans de nombreux autres tissus mais pas dans les ovaires sains (Rao & Park 2010; Rancourt et al. 2010).

La Mucine16 et sa forme soluble CA 125 constituent donc des cibles thérapeutiques et diagnostiques. Des aptamères spécifiques seraient un moyen de ciblage de la tumeur pour l'imagerie lors de l'opération de cytoréduction, pour l'adressage de molécules thérapeutiques et pour le suivi du taux de CA 125 sérique.

## 1.2 Traitement anti-angiogénique

Les mécanismes cellulaires conduisant à la récurrence d'un adénocarcinome ovarien sont mal compris mais de récents travaux impliquent le microenvironnement tumoral dans la reprise de la maladie résiduelle (Whiteside 2008). Cet effet pro-tumoral passerait entre autres par des interactions directes entre cellules stromales et cellules tumorales ainsi que par la sécrétion de facteurs de croissance et pro-angiogéniques (Whiteside 2008). Parmi les cellules stromales ovariennes, les cellules « hôte » ou « hospicells » sont capables d'influer le développement des cellules tumorales. Les travaux du Pr Bettina Couderc ont montré que leur présence favorise l'angiogenèse au site tumoral permettant une croissance tumorale accélérée par l'apport de nutriments et d'oxygène, et la dispersion métastatique par l'accès aux réseaux circulatoire et lymphatiques systémiques (Pasquet et al. 2010; Martin & Schilder 2007).

L'angiogenèse est un phénomène cible dans la mise en place de traitements anti-tumoraux. Les essais cliniques actuellement menés portent sur l'inhibition du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), la tyrosine kinase et l'angiopoïétine (Teoh & Secord 2012; Sato & Itamochi 2012). Les traitements actuels anti-angiogéniques de l'adénocarcinome ovarien donnent des résultats peu significatifs (16 à 28% de réponses objectives) et s'avèrent relativement toxiques et d'un coût élevé (Sato & Itamochi 2012; Pasquet et al. 2010; Teoh & Secord 2012). La sécrétion d'IL-6 a été plusieurs fois reportée dans le cas des EOC (Chou et al. 2005; Plante et al. 1994). Lors de l'analyse de l'ascite ovarienne obtenue après co-injection de cellules tumorales et d'hospicells, une augmentation de la synthèse d'interleukines 6 et 8 a été observée par rapport à l'ascite obtenue par injection de cellules tumorales seules, alors que les hospicells n'en sécrètent pas (Castells et al. 2012; Pasquet et al. 2010).

Ces deux interleukines ont été identifiées comme des facteurs pro-angiogéniques et pro-tumoraux dans une variété de cancers (Wu et al. 2012;

Heidemann et al. 2003; Raman et al. 2007; Azenshtein et al. 2005) et notamment le cancer épithélial ovarien (Nilsson et al. 2005). Elles constituent des cibles thérapeutiques potentielles dont l'inhibition au site tumoral pourrait limiter l'angiogenèse.

## 2 Les Aptamères

Au début des années 1990, trois différents laboratoires ont développé une méthode *in vitro* de sélection et d'amplification pour isoler des acides nucléiques spécifiques capables de se lier à une molécule cible avec une grande affinité et spécificité (Tuerk & Gold 1990; D. L. Robertson & Joyce 1990; Ellington & Szostak 1990). Cette méthode a été nommée SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) et les oligonucléotides résultants ont été appelés aptamères, du latin « *aptus* », *adapté à*. Les aptamères sont typiquement composés d'ARN, d'ADN simple brin ou d'une combinaison de l'un d'eux avec des nucléotides de synthèse. Ils ont une taille pouvant aller de 6 à 40 kDa. Ils sont isolés à partir de bibliothèques d'acides nucléiques extrêmement complexes, générées par chimie combinatoire, par un processus itératif de liaison, d'éluion et de réamplification. Après un enrichissement suffisant, les aptamères sont identifiés et étudiés pour leur liaison à la cible en tant que population homogène. Grâce à leur structuration tridimensionnelle, caractérisée par des tiges, des boucles latérales, des épingles à cheveux, des triplexes et des quadruplexes, les aptamères peuvent se lier à une grande variété de molécules cibles telles que des ions, des antibiotiques, des petites molécules, des acides aminés, des nucléotides, des peptides, des oligosaccharides ou des protéines. Ils se lient sélectivement à leur cible par des interactions de Van der Waals, des liaisons hydrogène, des empilements de cycles aromatiques, des interactions électrostatiques ou une combinaison de ces interactions (Hermann & Patel 2000; Patel et al. 1997). La plupart des aptamères décrits présentent des constantes de dissociation (Kd) de l'ordre du bas nanomolaire voire du picomolaire, équivalentes et même parfois supérieures à celles observées pour des anticorps monoclonaux envers leur antigène. Les aptamères présentent une grande spécificité

leur permettant de discriminer leur cible par rapport à leurs dérivés. Les exemples fréquemment cités sont ceux de l'aptamère anti-théophylline qui possède une affinité dix mille fois moindre pour la caféine qui ne diffère que d'un groupement méthyle (Jenison et al. 1994), et de l'aptamère anti-L-arginine avec douze mille fois moins d'affinité pour la D-arginine (Geiger et al. 1996) ou encore l'aptamère anti-oxytétracycline qui ne fixe que très peu la tétracycline (un groupement hydroxyle de différence) (Niazi et al. 2008).

Des aptamères de nature peptidique existent également, ils sont obtenus par la technique du phage-display mais nous nous contenterons de parler seulement des aptamères d'acides nucléiques dans cette thèse (Li et al. 2011).

### **3 Les Avantages des Aptamères**

Le principal avantage des aptamères tient à leur mode de sélection et de synthèse. Contrairement aux anticorps, ils ne nécessitent pas d'animaux pour leur sélection et leur production. L'immunisation *in vivo* n'est pas nécessaire pour l'obtention d'aptamères puisqu'ils peuvent être isolés et synthétisés *in vitro*. De ce fait, les toxines et les molécules n'induisant pas de bonne réponse immunitaire, contre lesquelles il est difficile de générer des anticorps, peuvent être utilisées pour générer des aptamères de haute affinité. Le processus *in vitro* est aussi approprié pour développer des systèmes automatisés de sélection. Des entreprises se sont créées dans le but de faire de la sélection à haut-débit et les processus de SELEX ont été modifiés et ont évolués au cours des années pour fournir des aptamères de meilleure spécificité et affinité en une durée moindre (BasePair Biotech, Novaptech, etc...). Les conditions de sélection et les paramètres cinétiques peuvent être ajustés de manière à contrôler les propriétés de liaison des aptamères à leur cible. Les aptamères sont produits par synthèse chimique avec une grande pureté et reproductibilité. Des molécules de marquage peuvent être couplées à des sites. La dénaturation des aptamères est réversible et ils peuvent être restructurés en quelques minutes. Ils peuvent également être conservés à température ambiante et

sur du long-terme. Les aptamères sont très sélectifs. Ils sont sélectionnés pour leur haute affinité envers une molécule cible ou un isoforme particulier d'une protéine cible et peuvent même distinguer deux états conformationnels différents d'une même protéine. Enfin, ils semblent ne pas présenter d'immunogénicité, ce qui les rend extrêmement attractifs pour en faire des outils thérapeutiques. Alors que la diversité des anticorps représente  $10^8$  à  $10^9$  immunoglobulines différentes possibles au sein d'un organisme, celle des aptamères est bien plus élevée ne serait-ce qu'au niveau de la séquence primaire, sans compter les multiples états de repliements. Une diversité de séquence primaire de  $10^9$  aptamères est explorée par une librairie ne faisant que 15 nucléotides de long alors qu'elles sont classiquement constituées de 20 à 80 nucléotides.

Les aptamères sont plus adaptables à des formats expérimentaux que leurs homologues anticorps, permettant de s'adapter aux exigences toujours croissantes des applications analytiques. De nombreuses facettes des aptamères comme leur thermostabilité, leur facilité d'immobilisation et de marquage contribuent à cette flexibilité accrue et les présentent comme des candidats très attractifs pour des applications diagnostiques et thérapeutiques. Cependant, les aptamères présentent des contraintes expérimentales. Par exemple chaque aptamère nécessite des conditions physicochimiques particulières pour une utilisation optimale (Walter et al. 2012). De plus il n'existe qu'un nombre limité d'aptamères disponibles, même s'il y a de plus en plus de publications en décrivant de nouveaux.

Anticorps	Aptamère
Leur développement nécessite des animaux, non applicable pour tout type de cible.	Identification via des techniques de sélection in vitro, virtuellement applicable pour tout type de cible.
La production in vivo induit des variations de lot à lot.	La synthèse chimique permet une grande reproductivité de production.
La modification n'est pas site-dirigée.	Durant la synthèse, les modifications peuvent être introduites à des positions définies.
Reconnaissent leur cible sous des conditions physiologiques ou proches.	Les conditions peuvent être définies de manière à générer des aptamères actifs sous ces conditions.
Sont sensibles à la température, leur dénaturation est irréversible.	Sont stables face à la température, leur dénaturation est réversible.
Durée de vie limitée, leur régénération peut induire une perte d'activité.	Longue durée de vie, Leur régénération peut être faite sans affecter leur activité.
Paramètres cinétiques non modifiables.	Paramètres cinétiques modifiables.
Haut poids moléculaire (~150 kDa pour IgG).	Bas poids moléculaire (13–26 kDa).

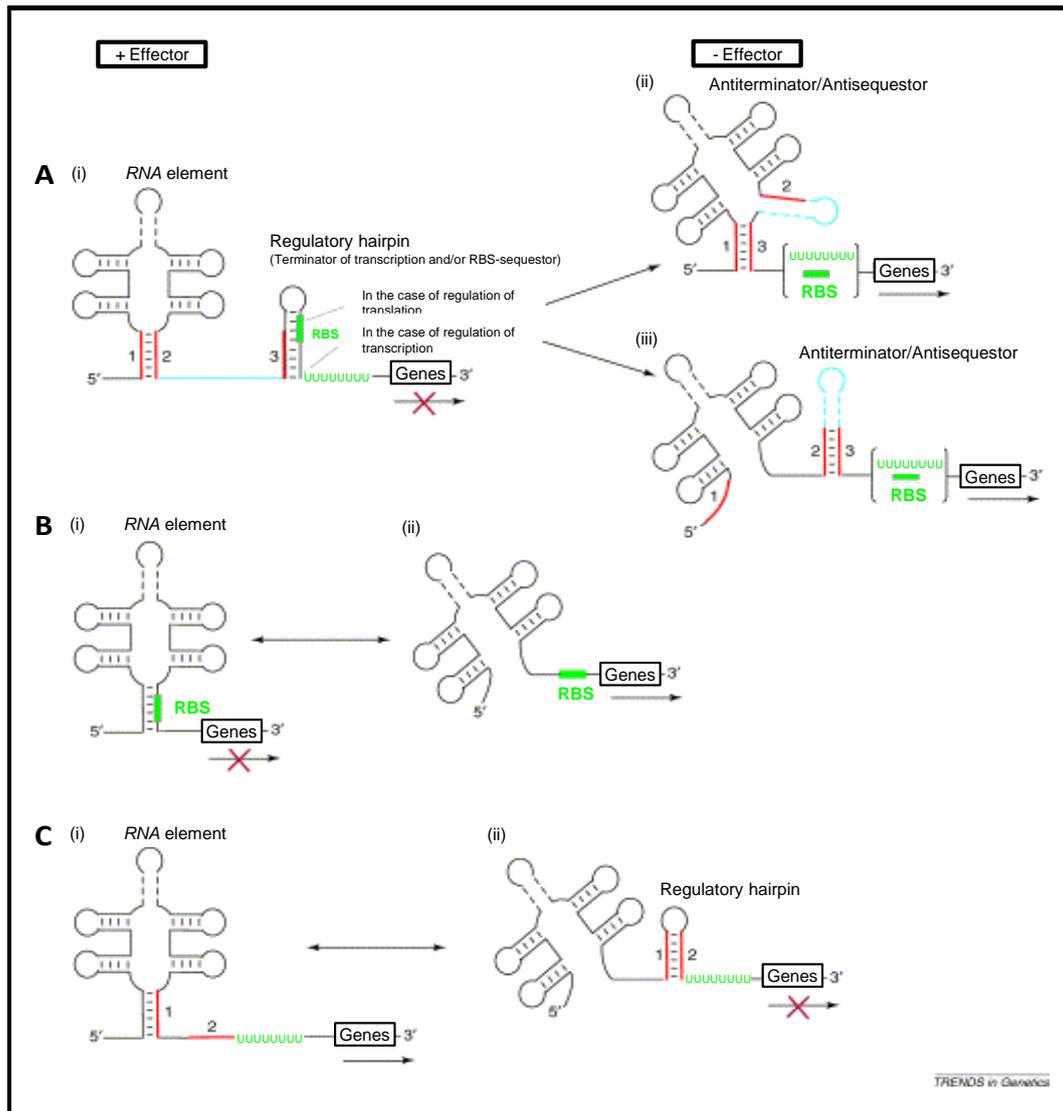
**Figure 3 : Comparaison des Anticorps et des Aptamères.** (Figure adaptée de (Walter et al. 2012))

## 4 Le SELEX

La possibilité d'isoler des acides nucléiques à partir de bibliothèques artificielles sur la base de leurs propriétés biochimiques a été largement discutée dans la communauté scientifique à partir de l'année 1988. Trois équipes indépendantes ont alors publiées leurs travaux en 1990. Le groupe de Gerald Joyce a utilisé une procédure de mutation, sélection et amplification *in vitro* pour isoler des ARN capables de cliver l'ADN à partir de ribozymes naturels à activité endo-ribonucléase. Bien qu'ils recherchaient une nouvelle activité enzymatique plutôt qu'une liaison spécifique et qu'ils utilisaient une molécule préexistante en la mutant plutôt qu'une bibliothèque aléatoire, les bases du SELEX étaient posées avec une évolution moléculaire par cycles itératifs de sélections et d'amplifications sur plusieurs cycles (D. Robertson & Joyce 1990). Puis le groupe de Larry Gold a décrit le processus expérimental visant à identifier la séquence reconnue par l'ADN polymérase T4. La bibliothèque utilisée étant basée sur la structure de la cible naturelle en épingle à cheveux avec les huit nucléotides de la boucle randomisés. Le processus de sélection *in vitro* a alors été breveté sous le terme de SELEX. Le premier SELEX a permis d'identifier une nouvelle séquence cible prédominante dans les séquences sélectionnées possédant une forte affinité pour l'enzyme, similaire à la séquence d'origine (Tuerk & Gold 1990). Moins d'un mois plus tard, le groupe de Jack Szostak a décrit une procédure de sélection *in vitro* permettant d'isoler des « molécules de liaison spécifiques au ligand ». Leur bibliothèque était alors composée de séquences aléatoirement synthétisées de 100 nucléotides, sans relation structurale avec des acides nucléiques prédéfinis et leurs cibles n'avaient pas de site de liaison connu pour les acides nucléiques. Ils ont utilisé la chromatographie d'affinité pour isoler des ARN avec des capacités de liaison spécifique pour des colorants organiques (choisis pour leur potentialité à créer des liaisons hydrogènes et leur structure planaire permettant de former des empilements avec les bases azotées de l'ARN). Ils ont alors appelé ces ligands nucléiques des « aptamères » (Ellington & Szostak 1990). Deux ans plus tard, le même groupe et le laboratoire pharmaceutique Gilead Science ont utilisé indépendamment la sélection *in vitro* pour isoler respectivement des

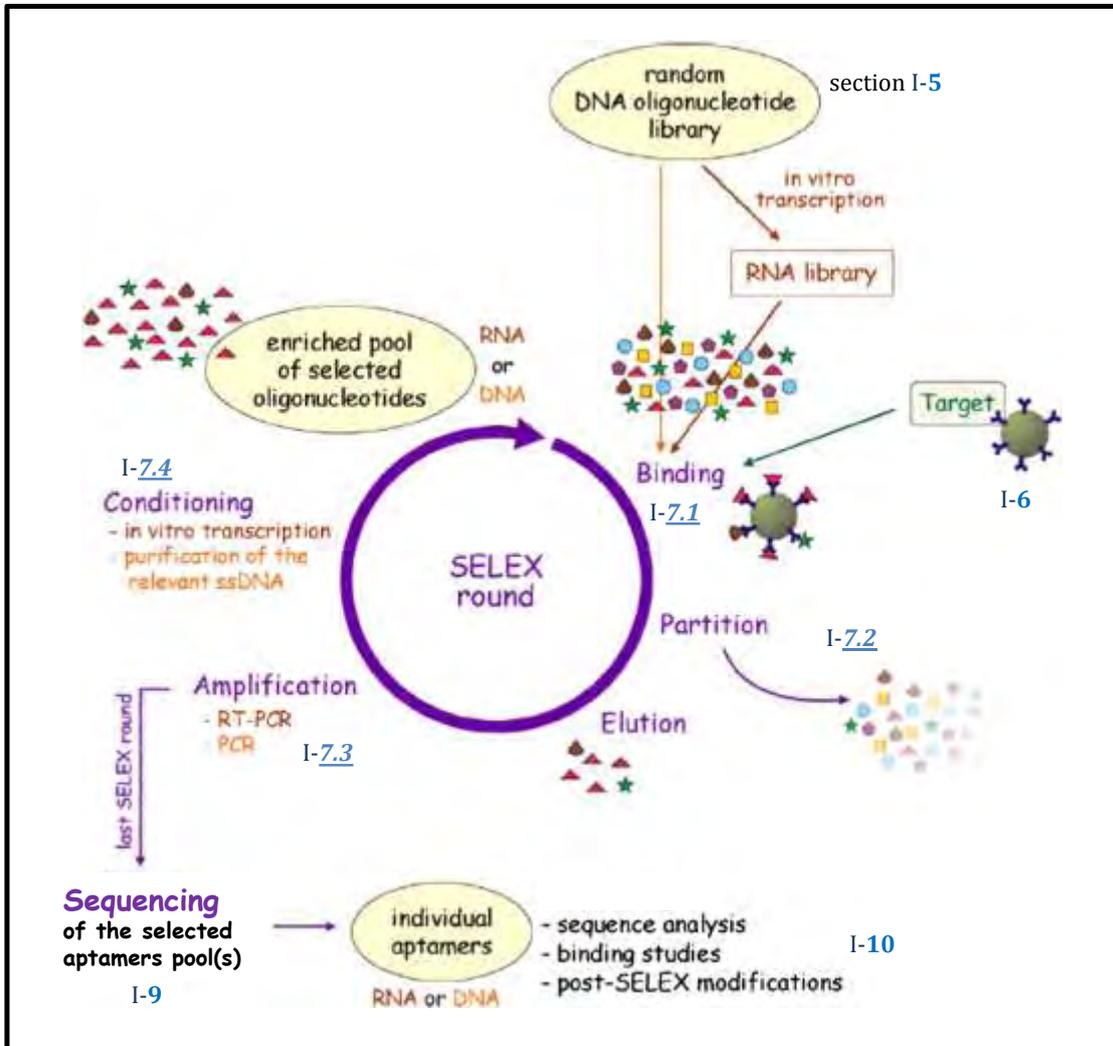
aptamères ADN contre des colorants organiques et la thrombine, protéine anticoagulante (Ellington & Szostak 1992).

Alors que la sélection d'aptamères *in vitro* eu un intérêt croissant dans le domaine de la biologie et des biotechnologies, la notion d'aptamères naturels a été mise en évidence en 2002 quand deux groupes menés par Ronald Breaker et Evgeny Nudler ont découvert sur des ARN messagers, un élément de régulation de la traduction possédant des propriétés de reconnaissance moléculaire semblable à celles des aptamères artificiels qu'ils ont appelé riboswitch (Winkler et al. 2002; Mironov et al. 2002). Très souvent, le ligand régulateur fixé par le riboswitch est un métabolite de la réaction catalysée par la protéine codée par l'ARNm ce qui conduit à un mécanisme de rétroaction directe. Ainsi le premier riboswitch identifié lie le pyrophosphate de thiamine et régule l'expression d'enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse de la vitamine B1 (Winkler et al. 2002; Mironov et al. 2002). L'adénosine, la lysine et la S-adénosylméthionine ont également été identifiées comme liant des riboswitches et régulant ainsi l'expression de leurs enzymes de biosynthèse (Lemay & Lafontaine 2006; Boyapati et al. 2012; Fiegland et al. 2012). Des mécanismes de régulations de riboswitches sont indiqués en **Figure 4**.



**Figure 4 : Mécanismes de régulation par modification structurale des riboswitches.** L'effecteur stabilise la conformation répressive en (A)(i) et (B)(i), alors qu'en (C)(ii) la conformation répressive se forme en absence de l'effecteur. Il peut y avoir atténuation de la transcription par terminaison prématurée (A)(ii) ou de la traduction par inhibition de l'initiation (A)(iii). L'atténuation de la traduction peut impliquer le confinement direct du site d'initiation de la traduction (B). L'activation se fait via l'inhibition de terminaison prématurée de la transcription (C). Les régions impliquées dans des interactions intramoléculaires différentes sont indiquées en rouge. Les éléments régulateurs, comme le site de liaison au ribosome (RBS) ou la séquence poly-Uracile du terminateur sont représentés en vert. (Figure adaptée de (Vitreschak et al. 2004))

Le processus de SELEX se caractérise par des cycles itératifs de sélection *in vitro* et d'amplification enzymatique des séquences sélectionnées qui mime une évolution Darwinienne conduisant à une propriété donnée (l'affinité pour un ligand par exemple). Les étapes clés sont présentées en **Figure 5**.



**Figure 5 : Sélection *in vitro* d'aptamères spécifiques pour une cible par la technologie SELEX.** Le point de départ de chaque processus de SELEX est une librairie synthétique d'oligonucléotides ADN randomisée constituée d'une multitude de fragments ADNsb de séquences différentes (environ  $10^{15}$ ). Cette librairie est utilisée directement pour la sélection d'aptamères ADN. Pour la sélection d'aptamères ARN, la librairie doit être transformée en librairie ARN. Le processus SELEX est caractérisé par une répétition cyclique d'étapes successives de sélection (liaison, partitionnement, élution), d'amplification et de conditionnement. Lors du premier cycle de SELEX, la librairie est incubée avec la cible pour la liaison. Les oligonucléotides non-liants sont éliminés par des lavages stringents des complexes

*de liaison. Les oligonucléotides liés à la cible sont ensuite élués et amplifiés par PCR ou RT-PCR. Une sous-librairie simple-brin enrichie en séquences sélectionnées est préparée par purification des brins « sens » (SELEX ADN) ou par transcription *in vitro* (SELEX ARN). Cette sous-librairie est utilisée pour le cycle suivant de SELEX. En général, 8 à 30 cycles de SELEX sont requis pour la sélection d'aptamères affins et spécifiques. Les séquences résultantes sont séquencées puis elles sont testées individuellement pour leur affinité et spécificité envers la cible. (Figure issue de (Stoltenburg et al. 2007))*

Un SELEX classique commence avec une librairie d'acides nucléiques synthétisés chimiquement, généralement constituée de  $10^{13}$  à  $10^{15}$  molécules différentes parce que compatible avec l'expérimentation (Gopinath 2011). Pour les SELEX visant à isoler des aptamères de nature ADN, cette librairie peut être utilisée sans aucun traitement préalable, alors que sa conversion en une librairie ARN doit être effectuée avant de commencer un SELEX d'aptamères ARN (pour plus de détails, consulter la section I-5). Dans les deux cas, les séquences d'ADN simple-brin ou d'ARN sont incubées directement avec la molécule cible. Après l'incubation, les complexes formés sont séparés des séquences non liantes ou de faible affinité (sections Introduction-[7.1](#) et [7.2](#)). Cette étape est l'une des plus cruciales du processus de sélection des aptamères et peut affecter grandement l'évolution moléculaire. Les oligonucléotides liés à la cible sont élués puis amplifiés par PCR dans le cas de l'ADN ou rétro-transcrits avant PCR dans le cas de l'ARN (section Introduction-[7.3](#)). A partir des ADN double brins résultant, les brins « sens » correspondant à la librairie de départ sont purifiés par déshybridation des double-brins ou par transcription *in vitro* et purification de l'ARN synthétisé (section Introduction-[7.4](#)). Cette sous-librairie enrichie d'oligonucléotides sélectionnés est utilisée dans le cycle suivant de SELEX. Par la répétition des cycles itératifs de sélection et d'amplification, la population de la librairie initiale est réduite à un nombre relativement limité de type de séquences discrètes. Le nombre de cycles nécessaire pour enrichir la librairie dépend de différents paramètres, tels que la cible considérée et sa concentration, le type de librairie utilisé, les conditions de sélection, le ratio entre la concentration en cible et en oligonucléotides ou encore l'efficacité du partitionnement entre les séquences liantes et non ou faiblement liantes. Des étapes peuvent être rajoutées dans le processus de sélection notamment pour augmenter la

spécificité des aptamères pour la cible. La sélection négative ou contre-sélection et la sélection soustractive sont fortement recommandées pour minimiser l'enrichissement en séquences liées de manière non spécifique ou pour diriger la sélection vers un épitope donné de la molécule cible. L'affinité des séquences pour leur cible peut être influencée par les conditions de stringence de la sélection. Classiquement, la stringence est progressivement augmentée au cours des cycles de SELEX par la réduction de la concentration en cible ou en changeant les conditions de liaison et/ou de lavages (concentration saline, compétiteurs non-spécifiques, volumes et durées des étapes) (Marshall & Ellington 2000).

Plusieurs méthodes ont été développées pour suivre un enrichissement en séquences affines ou pour suivre la diminution de la complexité des sous-librairies (section Intro-8). Généralement 8 à 30 cycles de SELEX sont nécessaires afin d'obtenir une sous-librairie d'aptamères ayant la plus forte affinité pour la cible. Les candidats aptamères des derniers cycles sont alors clonés et séquencés ou alors tous les cycles peuvent être directement séquencés par des techniques de séquençage de nouvelle génération à haut-débit (Next-Generation Sequencing) (section Int-9). Les séquences sont analysées afin de déterminer des homologues de séquences, des motifs ou des familles structurales (section Int-10). Les séquences jugées les plus pertinentes sont alors testées individuellement pour leurs propriétés de liaison envers la cible. Des mutations et des études de tronquage peuvent alors être réalisées afin d'identifier la séquence minimale conservant la meilleure affinité (section Int-11). Enfin, dans la plupart des cas, les aptamères identifiés sont modifiés post-SELEX, par exemple pour augmenter leur stabilité, pour les utiliser dans des approches analytiques de détection de la cible ou pour la purification du ligand.

Le SELEX est un processus qui répète quatre étapes principales successives : la liaison à la cible, le partitionnement des séquences liantes, l'amplification et la régénération des acides nucléiques simple-brins. Cependant, il n'y a pas de protocole standardisé pour n'importe quelle cible. La conception du protocole et les conditions spécifiques de sélection peuvent dépendre de la cible elle-même, de la librairie de départ utilisée ou des propriétés désirées pour les aptamères et du type d'application envisagée.

## 5 Les Librairies

Une librairie de SELEX classique est composée d'une multitude d'oligonucléotides contenant une région centrale de composition aléatoire de 20 à 80 nucléotides flanquée de deux séquences d'amorçage d'environ 20 nucléotides. Les séquences d'amorçages connues permettent l'hybridation des amorces pour l'amplification par PCR. La librairie est constituée d'ADN simple-brins synthétisés chimiquement et la zone dégénérée centrale est obtenue par l'incubation des quatre nucléotides en même temps lors de la synthèse. Comparativement à d'autres types de librairies, les banques aléatoires d'ADN simple-brin sont faciles à préparer par synthèse car la chimie d'incorporation des quatre phosphoramidites A, T, G et C est parfaitement maîtrisée.

Pour la sélection d'aptamères ADN, la librairie simple-brin « sens » peut être utilisée directement lors du premier cycle de SELEX. Cependant, certaines équipes préfèrent amplifier à grande échelle cette librairie et purifier les simple-brins générés avant de commencer la sélection, afin d'éliminer les produits de synthèse ADN qui ne seront pas amplifiables par PCR (Marshall & Ellington 2000). Les ADN polymérases n'ayant pas la même efficacité de polymérisation envers toutes les séquences, la représentativité des séquences difficilement amplifiables sera également diminuée.

Pour la sélection d'aptamères ARN, la librairie d'ADNsb doit être transformée en librairie ARN avant sa mise en interaction au premier cycle de SELEX ARN. Une amorce « sens » spécifique avec une extension en 5' contenant la séquence du promoteur T7 et l'amorce « antisens » permettent de transformer la librairie ADNsb en librairie ADNdb par PCR. Les ADNdb sont ensuite transcrits *in vitro* par l'ARN polymérase T7 afin d'obtenir la librairie ARN qui sera utilisée lors du premier cycle de SELEX. Les séquences éluées de la cible devront être rétro-transcrites en ADN puis amplifiées par PCR.

La région centrale dégénérée va conférer sa complexité à la librairie. Une librairie dégénérée sur  $n$  nucléotides aura une diversité de  $4^n$  molécules, ainsi une librairie avec 20 nucléotides aléatoires centraux aura une diversité de  $4^{20}$  molécules

soit  $1,1 \cdot 10^{12}$  alors qu'une librairie dégénérée sur 80 nucléotides aura une diversité de  $1,5 \cdot 10^{48}$  molécules différentes. Bien que n'importe quelle longueur de région aléatoire puisse être utilisée pour explorer  $4^n$  séquences différentes en théorie, le nombre maximal de séquences qui peuvent être manipulées dans les laboratoires standards de biologie moléculaire se situe à environ  $10^{15}$  molécules. Cependant la plupart des laboratoires n'explorent pas une diversité supérieure à  $10^{16}$  molécules lors d'un SELEX, ce qui correspond à 16nmoles. Une quantité plus importante nécessiterait de grands volumes pour être manipulée. Ceci signifie que les laboratoires utilisant des librairies dont la partie dégénérée est supérieure à 25 nucléotides n'explorent pas la totalité de la diversité de leur banque initiale. Cependant, l'exploration même partielle d'une longue librairie suffit à explorer un degré de complexité structural important. En effet, seule une courte partie de la séquence complète de l'aptamère suffit généralement à lier la cible. A titre d'exemple, l'aptamère sélectionné contre la thrombine par Louis Bock en 1992 a été obtenu à partir d'une librairie ADN de 96 nucléotides de longueur totale avec 60 nucléotides dégénérés. Il a ensuite été déterminé que seule une portion de la séquence entière composée de 15 nucléotides était nécessaire pour lier la thrombine (Bock et al. 1992). Ceci suggère qu'une librairie courte pourrait suffire à engendrer des aptamères. Les librairies courtes sont plus facilement manipulables, ont un coût moindre et les aptamères courts sont préférables pour un certain nombre d'applications. Les librairies longues auront l'avantage de cumuler plus fréquemment un motif court au sein d'une même séquence, augmentant la représentativité théorique du motif. L'augmentation de la longueur de la séquence s'accompagne d'une augmentation du nombre d'états énergétiques stables pour sa structuration (pléomorphisme structural). On peut considérer cela comme une limitation : la capacité d'une séquence donnée à adopter plusieurs structurations stables limite le nombre de représentants dans la « bonne » conformation pour reconnaître la cible. Mais on peut également considérer que cela définit un fort avantage sélectif : des séquences possédant une structuration « active » très prédominante parmi les différents états énergétiques seraient plus rapidement enrichies.

Une analyse informatique des structures de quelques 2000 aptamères sélectionnés contre 141 cibles uniques a permis de déterminer que dans la plupart des cas, les régions constantes d'hybridation des amorces ne contribuaient pas

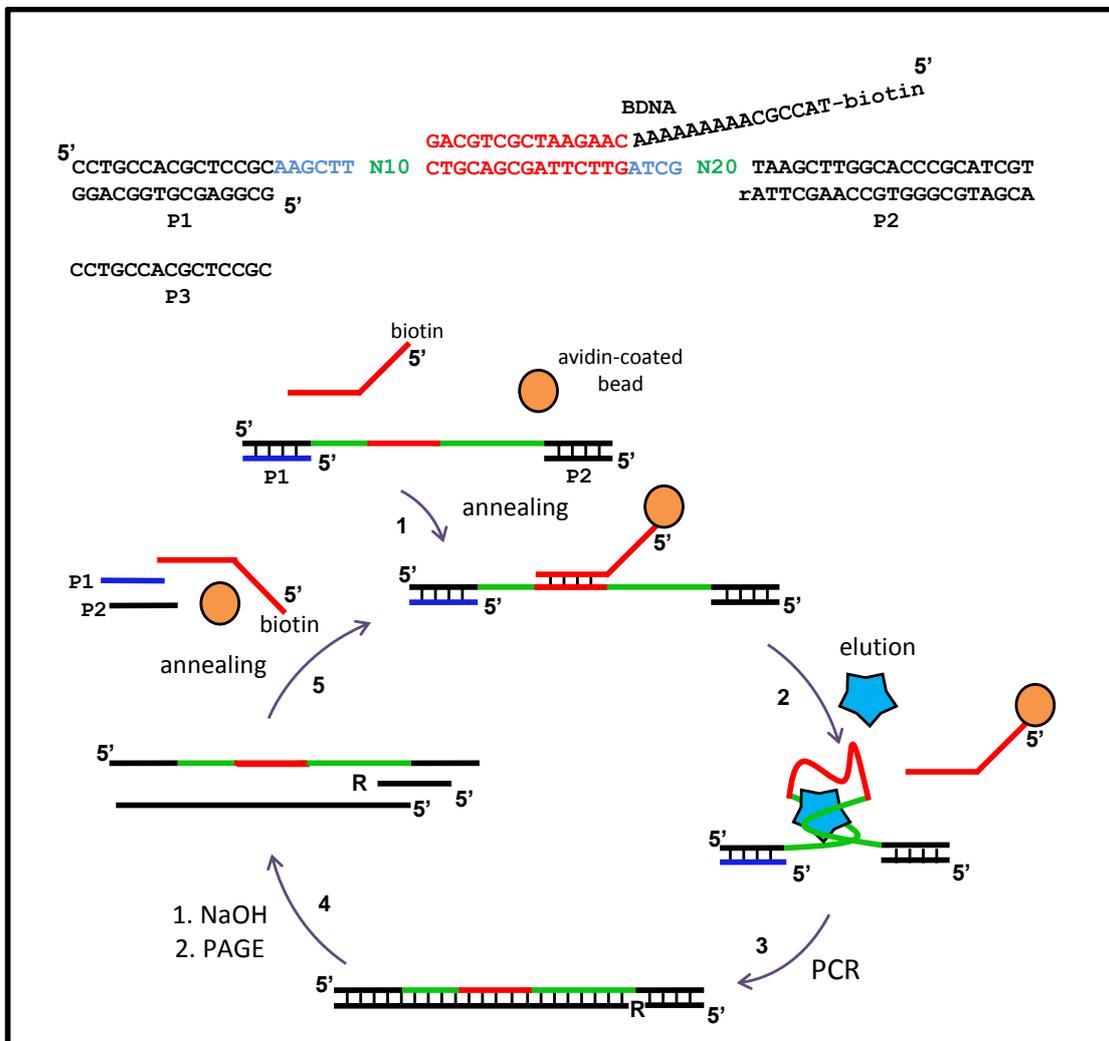
significativement à la structuration de l'aptamère (Cowperthwaite & Ellington 2008). Cependant, cette contribution ne semble pas la même suivant la longueur de la librairie. Une publication de Michal Legiewicz *et al.* fait état de 11 SELEX réalisés suivant le même protocole de sélection contre l'isoleucine avec 11 librairies différentes de 6 longueurs distinctes (N=16 à 90 nts). La participation des séquences constantes à la structuration était plus importante pour les librairies courtes. Toutes les tailles de librairie ont abouti à l'identification de la même séquence surreprésentée à l'exception de la librairie courte (N=16). Parmi les librairies de même taille, ils ont recherché l'impact des séquences fixes d'hybridation des amorces à se structurer sur elles-mêmes pour former des structures secondaires. Ils ont observé un effet négatif de la préformation de structure dans les régions fixes sur l'abondance du motif d'un facteur 5 à 10 (Legiewicz *et al.* 2005).

Dans le but d'augmenter la stabilité des oligonucléotides, des librairies modifiées sont parfois utilisées lors de la sélection. Pour les ARN, les modifications sont introduites sur la position 2' des résidus pyrimidines, tels que 2'-aminopyrimidines (Lin *et al.* 1996), 2' fluoropyrimidines (Rusconi *et al.* 2002), 2' O-méthyl nucléotides (Burmeister *et al.* 2005) entre autres. L'approche alternative par modification du squelette phosphodiester a été utilisée pour la sélection d'aptamères ADN contenant des phosphorothioates (King *et al.* 1998). Une revue sur le SELEX fait état des nombreuses modifications utilisées (Stoltenburg *et al.* 2007).

Une autre façon de produire des aptamères résistants aux nucléases est de sélectionner un aptamère qui se lie à l'énantiomère de la cible puis de synthétiser son énantiomère qui lui, reconnaîtra la cible « naturelle ». Cet aptamère de série non naturelle L-ribose ne peut pas être dégradé par les nucléases classiques. Ces composés s'appellent de « spiegelmers » et sont développés par NOXXON Pharma AG. A titre d'exemples, il existe des aptamères L-ADN contre la vasopressine (Williams 1997), des aptamères L-ARN contre la L-arginine (Nolte *et al.* 1996) ou encore le facteur de complément C5a (Hoehlig *et al.* 2013).

Dans certains cas, des librairies pré-structurées ont été utilisées. La région centrale aléatoire est alors flanquée par deux régions fixes capables de former une structure secondaire particulière généralement en tige-boucle (Hamm *et al.* 2002). D'autres librairies ne sont pas dégénérées sur toute la longueur de la partie centrale.

L'exemple le plus fréquemment rencontré est celui de bibliothèques précontraintes pour la formation de structure G-quadruplex (Hamm 1996; Hamm et al. 1997; McManus & Li 2013). Une bibliothèque permettant de sélectionner des aptamères dont la structure change en présence de la cible a également été développée (**Figure 6**). Cette bibliothèque contient une région spécifique de 15 nucléotides encadrée par deux régions aléatoires de 10 et 20 nucléotides, elles-mêmes encadrées par les régions d'hybridation des amorces. La région spécifique au sein de la portion dégénérée est complémentaire d'un oligonucléotide couplé à la biotine, puis la bibliothèque est fixée par le biais de l'hybridation ADN à une surface solide recouverte avec de l'avidine. Les séquences de la bibliothèque capables de lier la cible se détachent du support de par le changement structural induit par la formation du complexe (Nutiu & Li 2005).



**Figure 6 : Sélection d'aptamères par changement de structure.** La bibliothèque est décrite en (A) : les séquences P1 et P2 empêchent la participation des extrémités de la bibliothèque au repliement, la séquence définie au centre de la bibliothèque (rouge) permet

son accrochage aux billes avidine via la biotine. Le processus de SELEX est décrit en (B) avec la sélection des oligonucléotides dont la liaison à la cible entraîne la déshybridation de la séquence définie centrale (rouge) et son élution de la colonne. (Figure adaptée de (Nutiu & Li 2005))

Les aptamères ainsi sélectionnés sont très facilement adaptables pour la création de biosenseurs via un système de FRET ou de quenching de fluorescence entre les deux oligonucléotides (section Introduction-[12.3](#)). Enfin, Ruff *et al.* (Ruff et al. 2010) ont créé une librairie dégénérée sur 60 nucléotides contenant des « séries » alternant une purine et une pyrimidine sur des longueurs de 6 bases (librairie RY). Cette dégénérescence orientée permet d'augmenter fortement la formation de structures secondaires par la plus grande probabilité de générer des zones d'appariement entre les « séries » que sur une librairie classique. Leur but était de démontrer qu'une librairie enrichie en structures secondaires est plus à même de générer des aptamères contre trois cibles, la streptavidine, l'immunoglobuline E et le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Dans 2 cas sur 3, l'aptamère le plus affin a été obtenu avec la librairie RY, cependant l'utilisation du clonage classique pour l'identification des séquences sélectionnées et le faible nombre de séquences testées ne donne qu'une faible fiabilité à cette observation et ne permet pas de généraliser le concept.

Il est important de noter qu'il est préférable d'utiliser une librairie contenant déjà les modifications nécessaires à l'utilisation que l'on souhaite faire ultérieurement de l'aptamère isolé. En effet, toute modification faite sur un aptamère peut changer son affinité ou entraîner une modification de sa structure qui empêchera la reconnaissance de la cible. Toute incorporation de modification préalable au SELEX permet de limiter l'ingénierie nécessaire à l'utilisation expérimentale de l'aptamère identifié.

Nous avons réalisé 5 SELEX que l'on peut qualifier de classiques contre 4 protéines différentes lors de cette thèse en utilisant 3 librairies (Librairies 1, 2 et 5). Pour des raisons de facilité, de manipulation, de coût et parce que la chimie des désoxyribonucléotides est très développée à Toulouse, nous avons choisi de sélectionner des aptamères ADN à partir de librairies de format classique et ne possédant pas d'autre modification que le couplage à un fluorophore (fluorescéine)

en 5' pour des facilités de suivi expérimental des séquences. Les bibliothèques 2 et 5 sont dégénérées sur 25 nucléotides et la bibliothèque 1 sur 40 nucléotides. Les bibliothèques 1 et 2 sont des bibliothèques ayant été publiées et ayant permis de sélectionner efficacement des aptamères de haute affinité dans d'autres laboratoires (Murphy 2003; Bouvet 2000). La bibliothèque 2 comporte une zone d'appariement sur 5 nucléotides entre ces parties fixes, elle est donc pré-structurée. La bibliothèque 5 ayant servi au SELEX contre la protéine Mucine16 a elle été entièrement conçue par nos soins afin de répondre à un certain nombre de critères définis en section Résultats-**3.3.1**.

## 6 Les Molécules Cibles

Le fait que des aptamères aient pu être développés contre des petits ions tels que le  $Zn^{2+}$  (Ciesiolka et al. 1995) ou le  $Ni^{2+}$  (Hofmann et al. 1997), des nucléotides comme l'ATP (Huizenga & Szostak 1995; Sassanfar & Szostak 1993), des oligopeptides (Nieuwlandt et al. 1995) et de grosses glycoprotéines comme CD4 (Kraus et al. 1998) démontre la large gamme de cibles accessible à ces molécules. La plus petite cible moléculaire à ce jour est l'éthanolamine (Mann et al. 2005) et les types de cibles sont très diversifiés, incluant des colorants organiques (Ellington & Szostak 1990; Wilson & Szostak 1998), des dissaccharides (Yang et al. 1998), des antibiotiques (Famulok & Hüttenhofer 1996), des neurotransmetteurs (Mannironi et al. 1997), des pigments (Li et al. 1996) et des vitamines (Sussman et al. 2000).

Le SELEX est plus indiqué pour l'identification d'aptamères contre des molécules de taille importante, qui offrent une grande surface d'interaction. Les aptamères ciblant de petites molécules ont en général un  $K_d$  de l'ordre du millimolaire voire du micromolaire, loin du nanomolaire et picomolaire observé contre la plupart des cibles protéiques. Cependant, Plummer *et al.* ont développé une technique pour sélectionner des aptamères contre de petites molécules en liant la cible à une protéine présentatrice. Les séquences sélectionnées ont un  $K_d$  inférieur à 50 nM (Plummer et al. 2005). Les protéines constituent de bonnes cibles à en juger

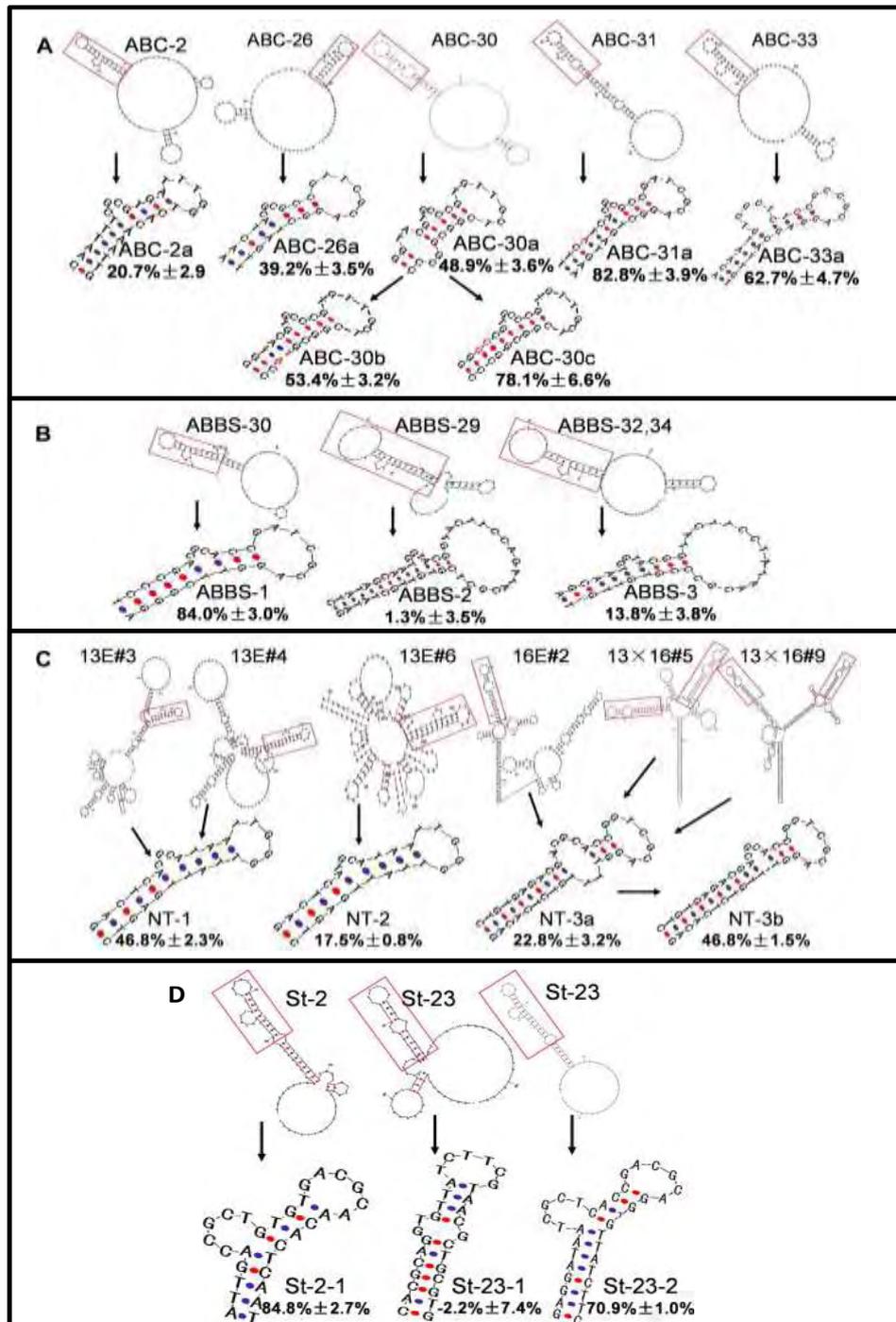
par l'abondance d'articles décrivant des aptamères contre des cibles protéiques (Lee et al. 2004).

Quand les sites de liaison des aptamères (aptatopes) ont pu être identifiés sur des cibles protéiques, il est fréquent d'observer qu'ils sont discrets et reconnus par des aptamères de familles de séquence différentes. Par exemple, les 6 classes d'aptamères anti-VEGF lient la même région, en compétition avec l'héparine et d'autres ligands naturels du VEGF (Ruckman et al. 1998; Jellinek et al. 1994). De plus, 5 différentes classes d'aptamères contre la protéine CD4 lient tous une seule et unique région sur les 4 domaines immunoglobulin-like (Kraus et al. 1998), contrairement aux anticorps monoclonaux anti-CD4 qui reconnaissent plusieurs épitopes sur chaque domaine. Ceci suggère que seule une petite proportion de la surface des macromolécules est accessible aux aptamères – probablement les régions de grande accessibilité au solvant où les résidus chargés positivement permettent des interactions électrostatiques avec les aptamères (Gopinath 2011). Les phénomènes de répulsion Coulombienne entre le squelette phosphate et les acides aminés chargés négativement peuvent expliquer l'existence d'aptatopes. Des travaux préliminaires montrant une corrélation entre la charge nette d'une protéine et l'affinité des aptamères sélectionnés ont été menés sans toutefois apporter de réponse définitive (Ahmad et al. 2011).

Un autre argument à l'existence d'aptatopes est la comparaison des multiples aptamères obtenus contre la streptavidine. Au moins sept différents SELEX ont aboutis à la sélection d'aptamères anti-streptavidine (Bittker et al. 2002; Wang et al. 2009; Stoltenburg et al. 2005; Qian et al. 2009; Oh et al. 2011; Paul et al. 2009; Ruff et al. 2010). Les aptamères obtenus avec quatre d'entre eux après des protocoles de SELEX, des bibliothèques, des tampons de liaison et des partitionnements différents ont été comparés (Bing et al. 2010). Une structure secondaire partagée avec une boucle latérale et une épingle à cheveux (soit environ 29 nucléotides) a été identifiée chez tous ces aptamères et s'avère être le motif de liaison à la streptavidine (**Figure 7**). Les séquences primaires formant ces motifs sont différentes, seuls quelques nucléotides dans la boucle latérale et la boucle terminale sont nécessaires à la liaison, les autres étant variables. La liaison à la streptavidine de chacun de ces aptamères a pu être abolie par compétition à la biotine, ce résultat signifiant que tous

les aptamères et la biotine se lient au même site sur la streptavidine. L'évolution des aptamères a donc été dominée par la liaison à seulement quelques groupements spécifiques sur la streptavidine, probablement parce que ce site est plus accessible ou possède plus de résidus capables d'interagir avec les groupements de l'ADN.

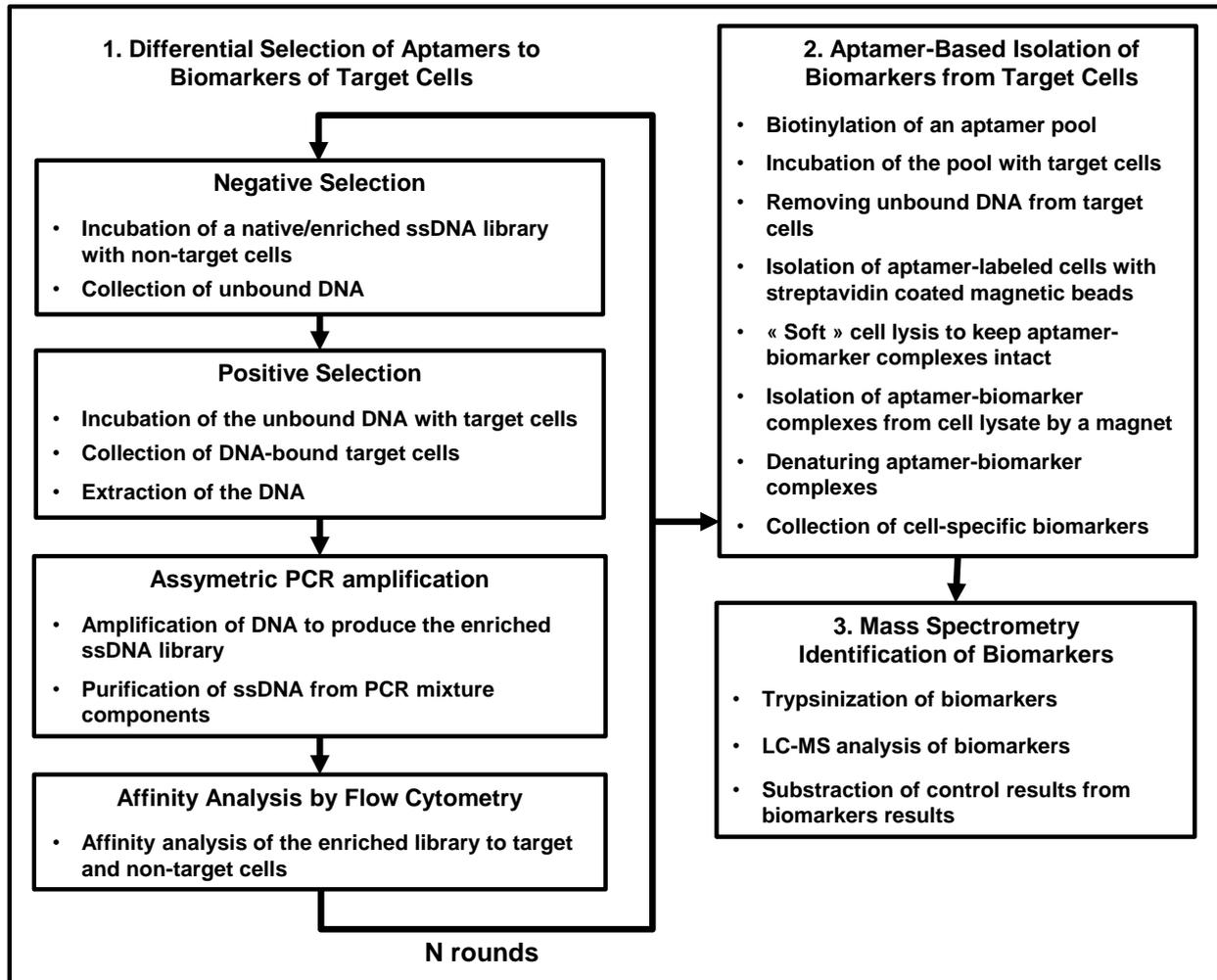
Une cible peut également posséder plusieurs « aptatopes ». Deux aptamères ADN qui lient des sites différents sur la thrombine ont été sélectionnés par deux laboratoires différents (Bock et al. 1992; Tasset et al. 1997).



**Figure 7 : Comparaison des aptamères anti-streptavidine.** Les structures secondaires prédites des aptamères générés par le laboratoire de Beate Strehlitz (A), de Chenglong Wang (B), de David R. Liu (C), de Dihua Shangguan (D) et leurs sites de liaison à la streptavidine. Les pourcentages dénotent le pourcentage de compétition de chaque séquence avec la séquence St-2-1. (Figure adaptée de (Bing et al. 2010))

Des SELEX ont également été menés contre des cibles complexes telles que des enveloppes cellulaires ou des cellules entières – on parle alors en général de Cell-SELEX mais aussi parfois de TECS-SELEX (Target Expressed on Cell Surface-SELEX) dans le cas où la cible recombinante est exprimée dans une lignée cellulaire (Ohuchi et al. 2006; Cerchia et al. 2005). Le principal avantage de ce type de SELEX vis-à-vis des traditionnelles méthodes *in vitro* est qu'il permet la sélection d'aptamères qui reconnaissent leur cible (un récepteur membranaire par exemple) dans son contexte membranaire natif, avec toutes les modifications post-traductionnelles qu'il peut comporter. Cette approche permet non seulement de s'affranchir de l'obtention de la protéine membranaire recombinante purifiée mais également d'éliminer le risque que l'aptamère sélectionné ne reconnaisse que la protéine purifiée et pas sa forme native sur les cellules vivantes. Etant données la taille extrêmement imposante (estimée à plus de 2 Méga Daltons) de la cible Mucine16 membranaire et sa nature avec un état de glycosylation très complexe, nous avons choisi d'utiliser l'approche Cell-SELEX pour l'identification d'aptamères ADN spécifiques. Sa production et sa purification sous forme entière et native relève de l'impossible. Les aptamères sélectionnés par Cell-SELEX contre des cibles extracellulaires ont un grand potentiel pour des applications diagnostiques et thérapeutiques. Ils ont permis d'isoler des types cellulaires à partir d'échantillon sanguin (Shangguan, Cao, et al. 2007), visualiser des cellules ou les suivre *in vivo*. Ils peuvent également permettre de moduler l'activité d'un récepteur cellulaire ou être des outils d'adressage moléculaire pour différents composés tels que des siRNA ou des drogues aux cellules cibles (Hicke et al. 2001; Cerchia et al. 2005; Wang et al. 2003; Vivekananda & Kiel 2006; Ohuchi et al. 2006; Daniels et al. 2003; Sefah et al. 2010; Van Simaey et al. 2010; Zhang et al. 2012; Shangguan et al. 2008; Liu et al. 2012; Jiménez et al. 2012; Herr et al. 2006; Iwagawa et al. 2012).

Les protocoles de Cell-SELEX évoluent continuellement. L'approche dénommée AptaBiD (Aptamer-Facilitated Biomarker Discovery) couple le Cell-SELEX à la purification de la cible *via* les aptamères sélectionnés et l'identification de la cible par une étude en spectrométrie de masse. Cette approche peut permettre d'identifier de nouveaux biomarqueurs (Berezovski et al. 2008). **(Figure 8)**



**Figure 8 : Démarche AptaBiD.** (Figure issue de (Berezovski et al. 2008))

Un Cell-SELEX a également été mené contre deux différents états d'une même lignée. Les cellules de contre-sélection sont des cellules endothéliales normales et la sélection est faite sur la même lignée cellulaire après activation d'un phénomène inflammatoire par TNF-alpha. Cette procédure a été baptisée SRC-SELEX pour Stimulus-Response Cell-SELEX (Ji et al. 2013).

## 7 Processus de Sélection

Le SELEX est une procédure itérative qui comprend trois principales étapes: la liaison à la cible, le partitionnement et l'amplification. L'étape de liaison consiste en la mise en interaction de la librairie d'oligonucléotides et de la molécule cible. Durant l'étape de partitionnement les complexes cible-candidat sont séparés des séquences non-liantes à la cible. Enfin, les séquences liantes sont amplifiées puis les brins « sens » purifiés afin de procéder à l'interaction du cycle de SELEX suivant (**Figure 5** section Introduction-4).

### 7.1 Liaison à la cible

La première étape d'un cycle de SELEX est l'incubation de la cible avec la librairie d'oligonucléotides. Cette incubation est faite dans des conditions prédéfinies de température et de tampon. Le but principal de cette étape est d'obtenir les représentants de la librairie ayant une haute affinité pour la cible. De plus, il est possible de modifier les conditions de stringence afin d'augmenter la pression de sélection en diminuant la concentration en cible ou en changeant les conditions de liaison et de lavages (Marshall & Ellington 2000). Durant l'étape d'incubation, les molécules cibles sont soit en solution avec la librairie soit liées à un support solide. Cette distinction de procédé est apparue très tôt dès les premières expériences de SELEX, où la cible était liée à une colonne d'affinité d'une part (Ellington & Szostak 1990) et où les deux partenaires étaient libres en solution d'autre part (Tuerk & Gold 1990). La liaison de la cible à un support peut présenter certains désavantages. La fixation de la molécule cible à un support solide empêche l'accessibilité des séquences du côté par lequel la cible est liée et diminue donc les possibilités de liaisons des aptamères. La présence d'une molécule servant d'espaceur entre la cible et le support peut également entraîner la sélection d'aptamères non-spécifiques pour la cible. Il est également difficile d'éluier les séquences les plus affines d'une colonne (Hamula et al. 2006).

Pour les sélections IL-6 et IL-8, nous avons choisi de ne pas fixer les protéines à un support et de procéder à l'interaction avec la librairie et la cible en solution libre.

## 7.2 Partitionnement

Durant l'étape de partitionnement les oligonucléotides liés sont séparés des séquences non liées à la cible. De nombreuses méthodes de partitionnement ont été décrites comme la chromatographie d'affinité, l'immobilisation de la cible sur des billes magnétiques, la centrifugation, la résonance plasmonique de surface, l'électrophorèse capillaire, la microscopie à force atomique ou la cytométrie en flux. La modalité de partitionnement choisie dépend de la cible considérée et définit le type de SELEX effectué : le Filter-Binding SELEX (Kubik et al. 1994; Green et al. 1996) pour un partitionnement sur filtre, le CE-SELEX par électrophorèse capillaire (Mendonça & Bowser 2004a), le Capture-SELEX où les aptamères sont fixés sur des billes (Stoltenburg et al. 2012), le M-SELEX où le partitionnement se fait en microfluidique par l'utilisation de billes magnétiques (Ahmad et al. 2011) et bien d'autres.

L'immobilisation de la cible est l'une des méthodes de partitionnement les plus efficaces pour la séparation des acides nucléiques liants et non liants lors du SELEX. Elle peut être réalisée par différentes approches physiques, covalentes ou d'affinité. La chromatographie d'affinité avec la cible immobilisée a ainsi été utilisée. Différents types de billes magnétiques sont utilisés en SELEX et ont permis la sélection d'aptamères avec une grande spécificité et affinité.

L'immobilisation de la cible pouvant empêcher l'accessibilité aux aptatopes, les méthodes telles que l'ultracentrifugation, l'électrophorèse capillaire et la filtration sur membrane de nitrocellulose présentent l'avantage de ne pas nécessiter de fixation de la cible pour le partitionnement. La méthode de partitionnement est la première étape à considérer lorsqu'on entreprend d'effectuer un SELEX. Elle sera choisie en fonction de la nature de la cible et de sa disponibilité, chaque procédé de partitionnement n'étant pas applicable à toutes les cibles. Les procédés électrophorétiques ne sont utilisables que si le complexe formé par l'aptamère et sa cible induit un changement important de mobilité électrophorétique du complexe. Les cibles non tagguées ne pourront pas être sélectionnées *via* des procédés de partitionnement nécessitant une immobilisation. Enfin, pour une cible membranaire il sera nécessaire d'effectuer un Cell-SELEX ou bien de produire la cible sous une forme soluble pour pouvoir appliquer un autre mode de sélection. La méthode de

partitionnement peut également conduire à la sélection d'aptamères selon des critères thermocinétiques prédéfinis (section Electrophorèse capillaire).

L'AFM (Atomic Force Microscopy) a été utilisée pour générer des aptamères ADN de très haute affinité pour la thrombine en seulement 3 cycles de SELEX. La librairie biotinylée a été fixée sur la pointe du cantilever via un recouvrement à la streptavidine. Une plaque d'or où la thrombine est fixée est parcourue par le dispositif et les séquences capables de forte liaison à la thrombine sont « arrachées » du levier par rupture de la liaison biotine-streptavidine. Les séquences accrochées à la plaque sont éluées par la chaleur et amplifiées pour procéder au cycle suivant de SELEX. Le meilleur aptamère sélectionné possède un  $K_d$  de 0,2 nM pour la thrombine déterminé par mesure de la polarisation de fluorescence de l'aptamère en présence de la cible. Ce  $K_d$  est meilleur que ceux des aptamères déjà connus et que celui de son analogue anticorps et a été confirmé par mesure de la force d'interaction en AFM (Miyachi et al. 2010).

Le SELEX par électrophorèse capillaire (CE-SELEX) permet la séparation des séquences non liantes et des complexes entre les aptamères et la cible. Les avantages majeurs de l'électrophorèse capillaire sont le fait que l'interaction se fait en solution, qu'elle peut avoir un très bon pouvoir de séparation et que l'on puisse ainsi fortement diminuer la coélution de séquences non-spécifiques. Ces deux derniers paramètres font que le CE-SELEX permet d'isoler des aptamères de haute affinité en un faible nombre de cycles (Mendonça & Bowser 2004a; Mendonça & Bowser 2005; Mendonça & Bowser 2004b). A titre d'exemple, le même aptamère sélectionné contre la ricine a été identifié par un SELEX en chromatographie d'affinité et un CE-SELEX, mais en moins de temps par la seconde méthode (Tang et al. 2006). Cependant, cette méthode nécessite d'observer un changement de mobilité électrophorétique des séquences lorsqu'elles sont complexées à la cible. Ce qui n'est pas forcément le cas pour les petites molécules par exemple (Qian et al. 2009). Une méthode basée sur les équilibres d'association et l'observation de la mobilité électrophorétique permet de sélectionner les séquences suivant des paramètres cinétiques et thermodynamiques prédéfinis. Cette méthode est appelée Equilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures (ECEEM). Elle a permis d'isoler un aptamère possédant un  $K_d$  de 15 nM contre la protéine MutS en seulement 3 cycles (Drabovich et al. 2005; Hamula et al. 2006). A partir de cette

méthode de SELEX, la NECEEM a été développée (qui signifie Non-ECEEM) visant à sélectionner les aptamères suivant leur gamme de constante de dissociation et leurs paramètres cinétiques d'association  $k_{on}$  et  $k_{off}$ . Cette technique se base sur la connaissance des temps de migration précis de la librairie, de la cible et du complexe. La sélection des séquences correspondantes aux paramètres de cinétiques d'interaction définis se fait en plusieurs injections successives en jouant sur la concentration en cible et les temps d'incubation avant injection. (Berezovski et al. 2005). La détection du complexe se fait traditionnellement en LIF (Light Induced Fluorescence) avec l'utilisation d'une librairie marquée. Une alternative en couplant le CE-SELEX et la RT-PCR (RealTime PCR) permet de détecter le complexe de manière indirecte dans les différentes fractions collectées (Ruff et al. 2012).

### 7.3 Amplification

L'amplification des séquences sélectionnées se fait par PCR. Lors de cette PCR, il est nécessaire de synthétiser le brin complémentaire de l'ADNsb élué après le partitionnement. Ce brin complémentaire que l'on nommera ici « antisens » doit ensuite être éliminé afin de récupérer seulement les brins « sens », copies des séquences éluées. La conservation des « antisens » pourrait conduire à la reformation des ADNdb et donc à l'impossibilité de structurer les ADNsb pour reconnaître la cible. Il y a de nombreuses techniques permettant de purifier l'ADNsb « sens » après l'amplification.

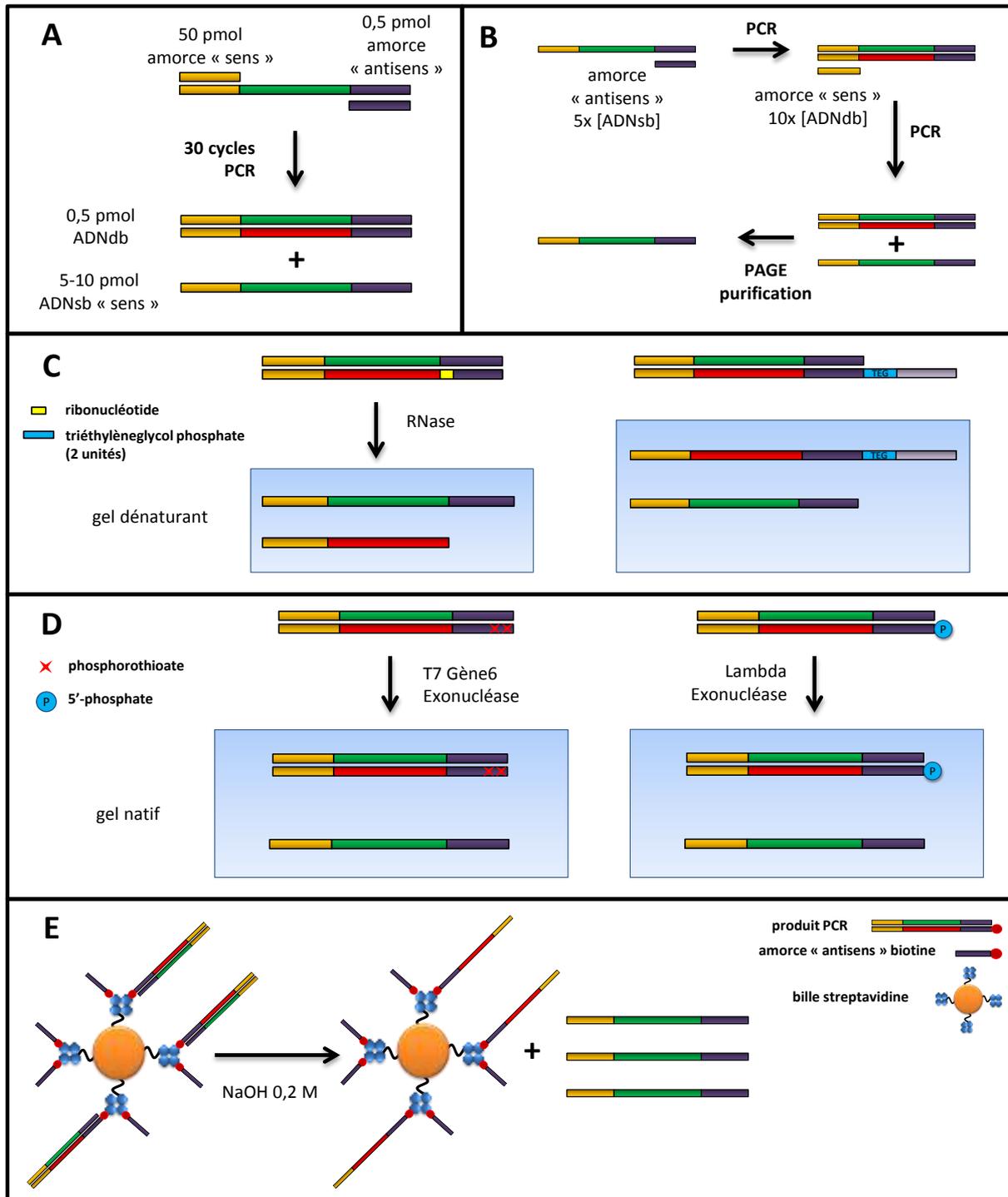
Cette étape d'amplification puis de purification du brin « sens » est considérée par la plupart des laboratoires comme l'étape critique dans la réalisation du SELEX. En effet, pour qu'une sélection soit efficace et aboutisse à des aptamères de très grande affinité, il est nécessaire d'être très stringent à chaque étape de sélection et de ce fait la quantité d'ADNsb éluée de la cible est très faible. A partir de cette quantité très limitée de matrice, il faut pourtant générer une grande quantité de produit d'amplification ADNdb (150 à 300 pmoles) avant purification des ADNsb pour procéder au cycle suivant. Or, il est impératif de minimiser au maximum le nombre de cycles de PCR pour y parvenir. La sur-amplification de produits aussi diversifiés qu'une librairie d'ADNsb peut entraîner l'appariement des séquences entre elles et l'apparition de produits de taille aberrante, la plupart du temps de taille supérieure à la taille désirée (Bell NAR 1991). Les paramètres de PCR doivent donc être

optimisés afin d'avoir la meilleure efficacité d'amplification possible. Ces paramètres dépendent de la librairie utilisée, de la quantité de matrice disponible ainsi que de la diversité présentée dans chaque sous-librairie issue de chaque cycle de SELEX. L'étape d'amplification test qui sert à déterminer le nombre de cycles PCR à effectuer à partir d'un échantillon de séquences éluées est classiquement appelée Pilot PCR. Le nombre de cycle permettant d'obtenir un amplicon à la taille attendue et en quantité maximale sans l'apparition de bandes non désirées sera retenu. Une amplification PCR à grande échelle sera ensuite effectuée pour générer une grande quantité de sous-librairie.

Les volumes d'élution des séquences après leur sélection sont en général de l'ordre de 100 à 500  $\mu\text{L}$ . A partir de ce volume, il faut arriver à générer 300 à 700 pmoles de produit PCR, ce qui nécessite un volume total de produits de PCR de l'ordre de 1,5 à 2,5 mL à une concentration de 120 nM environ (25 ng/5  $\mu\text{L}$  d'ADNdb pour une librairie de  $n=25$ ). Cette concentration finale permet de ne pas trop concentrer les produits PCR pour ne pas favoriser la formation d'amplicons de tailles non souhaitées. Afin de générer de tels volumes de PCR, nous avons procédé à d'amplification en cascade (section Méthodologie-5).

#### 7.4 **Génération de la sous-librairie d'ADN simple-brin.**

Les techniques ayant été développées pour la purification de l'ADNsb à partir d'un produit double-brin sont très diversifiées (**Figure 9**), cela traduit la difficulté rencontrée pour obtenir de bons rendements et une bonne reproductivité quelle que soit la technique utilisée.



**Figure 9 : Méthodes de purification de l'ADNs « sens ».** Les techniques de production d'ADNs « sens » par PCR asymétrique (A), par Single-Primer-Limited-Amplification (B), par purification de brins de longueur inégale (C), par digestion par des exonucléases (D) et par l'utilisation de billes streptavidine (E) sont illustrées.

#### 7.4.1 *PCR asymétrique :*

La PCR asymétrique se fait par l'utilisation d'un mix de PCR présentant des quantités inégales d'amorces « sens » et « antisens » (**Figure 9A**). Il y a deux phases d'amplification dans cette méthode. D'abord, la production exponentielle d'ADN<sub>db</sub> qui consomme l'amorce de plus faible concentration puis l'excès d'amorce de forte concentration est utilisée pour produire de l'ADN<sub>sb</sub> en phase linéaire d'amplification. La PCR asymétrique représente un faible coût en matériel et a été utilisée à de nombreuses reprises lors de SELEX. Les protocoles utilisés sont très variés dans les ratios d'amorces utilisés et le nombre de cycles de PCR (Miyachi et al. 2010; Ferreira et al. 2008; Javaherian et al. 2009). Il est conseillé de procéder à une étape de purification des ADN<sub>sb</sub> « sens » sur gel d'agarose ou de polyacrylamide non dénaturant. Il est à noter que cette étape peut entraîner la perte substantielle de matériel. Cependant des aptamères ont été sélectionnés suivant des protocoles sans purification des ADN<sub>sb</sub> issus de PCR asymétrique, par mise en interaction directe du produit de PCR asymétrique généré avec la cible (Low et al. 2009b; Low et al. 2009a).

#### 7.4.2 *Single-Primer Limited Amplification (SPLA) :*

Cette méthode récemment décrite s'inspire de la PCR asymétrique avec des rendements décrits comme étant 16 fois meilleurs. L'amplification des séquences éluées ne se fait dans un premier temps qu'en présence de l'amorce « antisens » en quantité 5 fois supérieure à la quantité de matrice (**Figure 9B**). Puis une seconde amplification est effectuée sur le produit obtenu par ajout de l'amorce « sens » en quantité 10 fois supérieure à la quantité de matrice (He et al. 2013).

#### 7.4.3 *Brins de longueur inégale :*

Une différence notable de migration électrophorétique des deux brins « sens » et « antisens » peut permettre la purification du brin « sens » sur un gel de polyacrylamide dénaturant (**Figure 9C**). Trois approches ont été abordées pour créer des produits PCR dont la longueur des deux brins est différente. La première utilise une amorce « antisens » contenant un terminateur de polymérisation et une séquence quelconque en 5' du terminateur. La synthèse du brin « sens » s'interrompra au niveau du terminateur et permettra de générer des produits PCR dont les deux brins complémentaires seront de taille différente (Williams & Bartel

1995). La seconde approche utilise une amorce « antisens » contenant un résidu ribose en 3'. Après amplification, un traitement par une ribonucléase va couper le brin « antisens » au niveau du résidu ribose et générer une séquence « antisens » plus courte que le brin « sens » (Walder et al. 1993). La dernière approche utilise une base sensible au pH en 3' de l'amorce « antisens » qui permet la coupure du brin en milieu basique (Keefe et al. 2010). L'ADNsb « sens » est ensuite purifié sur un gel PAGE dénaturant. Comme la PCR asymétrique, cette technique nécessite une purification post-PCR.

Dans le cadre d'une collaboration, nous avons étudié le comportement de deux ADN polymérases utilisées en PCR, la *Taq* ADN polymérase et la *Pfu* ADN polymérase qui possède une activité exonucléase 3'-5'. Nous avons séquencé les brins « sens » générés par chacune de ces enzymes lors de l'utilisation d'amorces « antisens » comportant deux unités de triéthylène glycol ou un autre type de terminateurs que sont les CNA (Constrained Nucleic Acids) (section Résultats-1).

#### 7.4.4 *Digestions par des exonucléases :*

L'utilisation d'amorces modifiées et le traitement des ADNdb par une exonucléase associée permettent de digérer sélectivement le brin « antisens » (**Figure 9D**). Les deux enzymes le plus couramment utilisées dans ce but sont la Lambda exonucléase et la T7 Gene6 exonucléase. La Lambda exonucléase digère sélectivement les brins 5'-phosphorylés d'une matrice d'ADNdb. Les amorces « antisens » utilisées lors de la PCR doivent être 5'-phosphorylées pour donner des produits PCR où les brins « sens » sont 5'-hydroxyle et les brins complémentaires « antisens » sont 5'-phosphorylés. Les brins « antisens » seront digérées après incubation avec l'enzyme (Higuchi & Ochman 1989; Avci-Adali et al. 2009). La T7 Gene6 exonucléase digère un seul brin d'ADN à partir d'une matrice double-brin dans la direction 5'->3' que l'extrémité soit 5'-phosphorylée ou 5'-hydroxyle. Pour protéger le brin « sens » de l'hydrolyse par la T7 Gene6 exonucléase, l'amorce « sens » contient des nucléotides portant une fonction phosphorothioate à son extrémité 5' (Nikiforov et al. 1994). Ces deux approches sont élégantes et ont été utilisées pour la génération d'ADNsb dans le SELEX mais elles impliquent un surcoût dû à l'utilisation des enzymes et d'amorces modifiées. De plus, la présence de l'enzyme même inactivée peut interférer avec la réalisation de protocoles lors du

SELEX comme pour le pyroséquençage par exemple. Il est donc nécessaire de procéder à une extraction phénol/chloroforme pour éliminer l'enzyme puis à une précipitation éthanolique, ceci peut entraîner une perte d'ADNsb. Cette technique bien qu'ayant été utilisée dans des processus de SELEX (Oh et al. 2011; Bibby et al. 2008) présente un certain nombre de désavantages. Le taux de phosphorylation des amorces « antisens » n'est pas de 100%, aussi des produits ADNdb sont toujours présents après digestion. De même les amorces « sens » non modifiées restent présentes. Une étape de purification sur gel de polyacrylamide natif, bien qu'elle permettrait d'identifier les bandes correspondant aux amorces et à l'ADNdb s'avère difficile, les ADNsb « sens » adoptant des structures tridimensionnelles qui génèrent des smears dans un gel natif (Nakabayashi & Nishigaki 1996).

#### 7.4.5 *Séparation Biotine-Streptavidine :*

La technique de purification d'ADNsb qui semble la plus répandue dans le SELEX utilise une amorce « antisens » 5'-biotinylée. Après l'amplification PCR, l'ADNdb biotinylé est fixé sur des billes coatées à la streptavidine (**Figure 9E**). Ces billes peuvent être montées dans une micro-colonne ou bien magnétiques. Les amorces « sens » non biotinylées, les dNTPs et tous les autres composants de la PCR sont éliminées par rinçage des billes. Les produits ADNdb et les amorces « antisens » sont eux retenus par affinité. Le brin « sens » non biotinylé est élué par dénaturation des double-brins soit par la chaleur (Mallikaratchy et al. 2007) soit par déshybridation alcaline (Daniels et al. 2003; Sefah et al. 2010). Les produits élués sont ensuite précipités à l'éthanol. Il a été rapporté que la dénaturation alcaline peut dissocier la streptavidine de son support, résultant en la coélution de streptavidine couplée à de l'ADNdb. Cette streptavidine peut ensuite servir de cible (Paul et al. 2009). Une autre approche consiste en l'incubation des produits PCR biotinylés avec de la streptavidine libre puis une migration électrophorétique en gel dénaturant urée-polyacrylamide. La fixation de la streptavidine entraîne un changement important de mobilité électrophorétique des brins « antisens ». La bande correspondant au brin « sens » est alors excisée (Pagratis 1996).

#### 7.4.6 *Comparaison des méthodes :*

Une publication fait l'objet de la comparaison des techniques couramment utilisées en SELEX pour générer de l'ADNsb, la PCR asymétrique, la digestion par

des exonucléases et la purification sur billes streptavidine (**Figure 10**). La qualité des produits purifiés a été contrôlée sur gel et s'est avérée satisfaisante pour chacune des techniques. Les quantités générées ont été déterminées par ELONA. Les résultats démontrent que la purification préalable des produits PCR n'entraîne pas de meilleurs rendements. La PCR asymétrique couplée à une digestion enzymatique montre la plus grande efficacité avec une grande quantité d'ADNsb générée (Svobodová et al. 2012).

Méthode utilisée pour la génération d'ADNsb	Rendement $\pm$ RSD%, (n = 5)	Quantité d'ADNsb (nM)	Durée estimée (h)	Coût estimé pour 50 pmol d'ADNsb (€)
Billes streptavidine <sup>a</sup>	57.3 $\pm$ 7.7	28.6 $\pm$ 3.9	1.5–2.5	68
T7 Gene 6 Exonucléase <sup>a</sup>	58.2 $\pm$ 9.8	29.1 $\pm$ 4.9	1.5–2	52
Lambda Exonucléase <sup>a</sup>	68.7 $\pm$ 6.9	34.6 $\pm$ 3.5	1.5–2	45
Billes streptavidine	51.9 $\pm$ 8.2	36.3 $\pm$ 5.7	1–2	30
T 7 Gene 6 Exonucléase	62.6 $\pm$ 8.7	43.5 $\pm$ 6	1–1.25	15
Lambda Exonucléase	52.3 $\pm$ 7.2	36.6 $\pm$ 5	1–1.25	14
A-PCR avec F_pto primer	72.4 $\pm$ 5.3	265 $\pm$ 19	0.75–1	2
A-PCR avec R_pho primer	66.7 $\pm$ 4.8	244 $\pm$ 19.5	0.75–1	2
A-PCR avec T7 gene6 Exo	83.9 $\pm$ 6.2	307 $\pm$ 22	1.5–2	4
A-PCR avec Lambda Exo	74.9 $\pm$ 6.5	274 $\pm$ 23.8	1.5–2	3
A-PCR (purification PAGE)	29.1 $\pm$ 10.6	106 $\pm$ 39	2–2.5	14

**Figure 10 : Comparaison des méthodes de génération d'ADNsb.** Le tableau permet une comparaison en termes de rendement, de quantité, de temps nécessaire et de coût pour 50 pmoles. F\_pto primer amorce « sens » phosphorothioates ; R\_pho primer amorce « antisens » 5'-phosphate ; <sup>a</sup>ADNsb généré à partir de produits PCR purifiés. (Figure adaptée de (Svobodová et al. 2012))

## 8 Suivi de l'Evolution du SELEX

Au cours du SELEX, le suivi de l'évolution de l'affinité moyenne des séquences des sous-librairies permet de contrôler et d'ajuster la pression de sélection *via* les conditions de stringence et d'obtenir des aptamères dans une gamme d'affinité souhaitée. Ces techniques nécessitent l'utilisation d'ADNsb purifié qu'il est coûteux de produire et difficile d'obtenir en grande quantité. C'est pourquoi tous les laboratoires ne font pas ce suivi.

Généralement, les laboratoires déterminent l'affinité moyenne des différentes sous-librairies par la même méthode qu'employée lors du partitionnement du SELEX. Pour les Cell-SELEX où le partitionnement physique se fait par prélèvement des séquences non-liées, il est possible d'effectuer des dosages de liaison des séquences marquées radioactivement. Cependant la plupart des études publiées faisant état d'un Cell-SELEX se servent de la cytométrie de flux pour étudier l'évolution de l'affinité moyenne des sous-librairies correspondant à chaque cycle de SELEX. Les méthodes développées ici seront des approches supplémentaires de suivi. Des techniques permettent de suivre l'évolution de la complexité des sous-librairies au cours du SELEX et donc de l'enrichissement en un nombre réduit de séquences (sections Introduction-**8.2**, **8.3** et **8.4**).

### 8.1 Dosage de fluorescence :

Les oligonucléotides des sous-librairies peuvent être couplés en 5' ou en 3' à une molécule fluorescente lors de la PCR par l'utilisation d'amorces « sens » marquées (Stoltenburg et al. 2005). Dans ce cas, il est possible de quantifier les séquences non retenues par la cible, éliminées lors des lavages et éluées par simple mesure spectrofluorimétrique. La comparaison de ces mesures au cours des cycles permet de se faire une idée sur l'efficacité de la sélection en confrontant les quantités de séquences éliminées ou éluées et les conditions de stringence utilisées. Il est à noter que cette méthode n'utilise aucun ADNsb supplémentaire, les mesures se faisant sur celui utilisé lors du cycle de SELEX considéré.

## 8.2 Chromatographie liquide de haute-performance en condition dénaturante (dHPLC) :

Le principe est de faire migrer les sous-librairies à travers une colonne de type Ion-Pairing Reversed Phase (IP RP), qui permet de séparer les analytes chargés tels que les acides nucléiques, en condition dénaturante en chauffant le dispositif à 70°C. Le profil d'éluion acquis par absorbance à 260 nm est comparé d'une sous-librairie à l'autre. Le profil arrondi de la librairie naïve évolue pour former une succession de pics correspondant aux séquences enrichies. Lorsque le profil n'évolue plus, le SELEX est considéré comme étant allé à son terme (Müller et al. 2008).

## 8.3 Analyse des températures de renaturation

L'enrichissement de séquences spécifiques et la diminution de diversité de la population associée peuvent être suivis par mesure des températures de renaturation des sous-librairies. Plus une sous-librairie est diversifiée en séquences, plus il faudra de temps pour observer la ré-hybridation après dénaturation complète (Schütze et al. 2011; Schütze et al. 2010; Thiel et al. 2012).

## 8.4 Analyse du polymorphisme par la longueur de fragments de restriction (RFLP) :

La technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) utilise un cocktail enzymatique d'endonucléases spécifiques pour de courts sites de restriction. Les différentes sous-librairies d'ADNdb marqué obtenues après PCR sont digérées par ce cocktail et les résultats sont analysés sur un gel de polyacrylamide dénaturant. Le nombre de fragments de tailles différentes obtenu sur le gel traduit de la diversité des séquences présentes dans la population considérée. Au cours de l'avancement du SELEX et la perte de diversité de séquences, le profil RFLP montre de moins en moins de bandes jusqu'à éventuellement ne plus en présenter qu'une qui sera la famille de séquences la plus enrichie (Pestourie et al. 2006).

## 9 Identification des Séquences

Une fois l'évolution terminée, l'analyse des séquences sélectionnées permet d'identifier des motifs consens. L'approche classique consiste à cloner les oligonucléotides issus du dernier cycle de SELEX et à séquencer les plasmides recombinants. Avec la mise au point des méthodes de suivi de l'évolution au cours du SELEX, il est désormais fréquent de voir cloner la sous-librairie issue du cycle présentant la meilleure affinité apparente et qui ne correspond pas nécessairement au dernier cycle. Le clonage se fait au moyen de techniques classiques de laboratoire et il génère une quantité de données facile à traiter. Cependant il nécessite un investissement en temps conséquent et la faible quantité de données générée offre peu de valeur statistique à l'analyse de l'évolution des séquences. Avec le développement de la bio-informatique et de la génomique, de nouvelles méthodes automatisées sont apparues pour séquencer de grandes quantités d'ADN sans nécessiter de clonage. Elles sont regroupées sous le terme de Next-Generation Sequencing et permettent d'obtenir de quelques milliers à des millions de séquences en une seule procédure (Cho et al. 2011; Nitsche et al. 2007) pour un coût modéré. Les trois principales approches développées et commercialisées par des entreprises concurrentes sont basées sur des chimies distinctes (Roche 454, Illumina et SOLiD).

Le coût et le temps nécessaire à la mise en œuvre d'un séquençage haut-débit est du même ordre que pour la réalisation de clonages sur plusieurs sous-librairies. Cependant la très grande quantité de données brutes après séquençage nécessite la maîtrise d'outils informatiques et une durée d'analyse relativement longue. En revanche, la forte valeur statistique permet de suivre de manière fiable l'évolution moléculaire au cours du SELEX.

### 9.1 Clonage – séquençage

L'approche la plus classiquement utilisée reste le clonage suivi d'un séquençage par la méthode de Sanger (Sanger & Coulson 1975).

Le plus fréquemment, la technique du TA cloning est employée sur les produits PCR issus des sous-librairies. Le « TA cloning » utilise l'activité terminale transférase double brin de la Taq DNA polymérase. Cette enzyme rajoute

principalement des résidus déoxyriboadénosine en 3' de chaque brin généré par PCR de manière matrice indépendante (Clarke 1988). Un vecteur à extrémités franches est alors traité avec une enzyme à activité terminale transférase en présence de résidus déoxyribothymidine. Cette technique ne nécessite pas d'enzymes de restrictions autres que pour la linéarisation du vecteur et est plus rapide et plus simple que les autres techniques de sous-clonage.

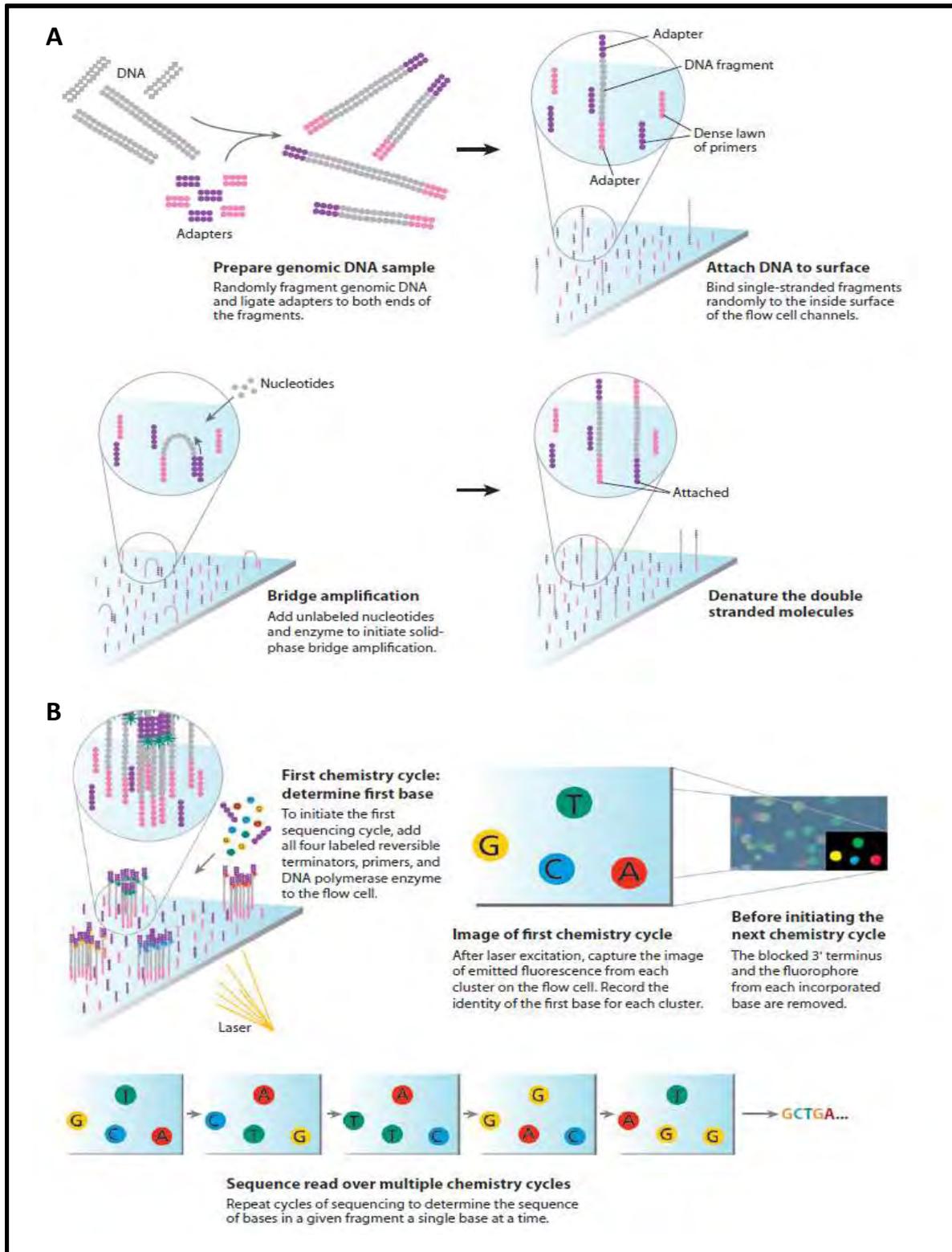
Lors de cette thèse, nous avons à plusieurs reprises utilisé la technique de clonage par utilisation d'enzyme de restriction et la constitution de concatémères. Ceci permet d'insérer plusieurs séquences au sien d'un même plasmide et ainsi de diminuer le coût de séquençage. Les séquences à cloner sont amplifiées avec des amorces correspondant à leurs parties fixes et rallongées d'une queue flottante en 5' comprenant un site de restriction (Kaufman & Evans 1990). Les produits PCR ADNdb obtenus sont de taille supérieure à la librairie initiale mais possèdent un site de restriction de chaque côté de la séquence. Il est également possible d'utiliser une librairie préparée pour le clonage direct, c'est à dire contenant déjà des sites de restriction dans chacune des deux parties constantes. Dans ces deux cas les produits PCR ADNdb sont digérés par les enzymes de restrictions correspondantes et clonées dans le vecteur. Cette technique présente le désavantage de pouvoir générer des produits clonés incomplets, si un site de restriction se situe dans la séquence dégénérée. Cependant, elle peut permettre la concatémérisation de plusieurs séquences et le séquençage de multiples séquences dans un seul plasmide.

## 9.2 Séquençage haut-débit Illumina

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé le séquençage haut-débit afin de traiter en un seul « run » la totalité des sous-librairies obtenues dans 4 SELEX différents. Nous avons établi une collaboration avec la plateforme génomique GénoToul qui utilise la technologie Illumina sur un appareil MiSeq. Les deux autres technologies courantes de séquençage haut-débit sont présentées en Annexes.

La technologie de séquençage haut débit Illumina (Solexa) est la seconde à avoir été développée. La première étape consiste en la ligation d'adaptateurs sur les produits PCR. Les séquences sont alors fixées aléatoirement sur une puce où des oligonucléotides complémentaires aux adaptateurs sont fixés (**Figure 11**). Chaque

séquence du produit PCR se fixe aléatoirement sur le support et plusieurs cycles de dénaturation/hybridation/élongation en présence de nucléotides et d'ADN polymérase permettent de créer localement des clusters de séquences (jusqu'à 1000 copies par cluster et jusqu'à 100 millions de clusters suivant la puce). L'amplification avec des amorces fixées à un support est appelée « bridge amplification ». L'étape de séquençage consiste à employer des amorces complémentaires d'un des deux adaptateurs et à ajouter simultanément quatre terminateurs réversibles marqués par des fluorophores différents. Après lavage, la longueur d'onde d'émission de fluorescence est observée pour chaque cluster, indiquant le nucléotide incorporé en première position. Puis le blocage d'élongation est éliminé et une nouvelle incubation permet de déterminer la base suivante, *etc...* La réaction, bien qu'automatisée s'avère lente et un « run » de séquençage prendra plus d'une journée.



**Figure 11 : Méthode de séquençage Illumina.** Des adaptateurs permettent de fixer les séquences à une puce et des cycles de PCR en pont génèrent de clusters de séquence unique (A). L'utilisation de nucléotides bloqués et fluorescents permet d'identifier les séquences (B). (Figure adaptée de (Mardis 2008))

## 10 Analyse des Populations de Séquences

Un motif consensus peut être défini comme une séquence nucléotidique moyenne. Chaque nucléotide est le plus fréquemment rencontré à cette position dans les séquences considérées. L'analyse des régions conservées est utilisée pour prédire les structures secondaires au sein des candidats aptamères sélectionnés à l'aide de programmes informatiques spécialisés.

### 10.1 Approche classique

Il y a désormais de nombreux programmes disponibles ([http://en.wikipedia.org/wiki/Sequence\\_alignment\\_software](http://en.wikipedia.org/wiki/Sequence_alignment_software)). L'un des plus anciens et le plus utilisé est Clustal qui permet l'alignement de séquences multiples et la préparation d'arbres phylogénétiques. L'algorithme utilisé procède à un alignement progressif des séquences les plus proches en premier lieu vers les plus divergentes. Cependant de nouveaux programmes émergent avec l'apparition des séquençages de nouvelle génération et la grande quantité de données générée tel que MAFFT. Le séquençage haut-débit conduit également à analyser les populations de séquences par rapprochement phylogénétique et plus récemment structuraux.

L'approche classique de clonage ne permet d'explorer qu'un nombre limité de séquences appartenant à un faible nombre de cycles, en général une centaine de séquences qui sont soit regroupées en famille puis un représentant de chaque famille est testé pour sa liaison à la cible, soit toutes les séquences identifiées sont testées étant donnée la faible valeur statistique du clonage face à des populations aussi diverses. Une observation générale que ce soit par séquençage haut ou bas débit est que ce ne sont pas forcément les séquences que l'on retrouve en plus grand nombre de copies qui sont les plus affines. Ceci est certainement dû à l'aspect évolutif de la population et au biais introduit par la PCR et les différences d'efficacité d'amplification d'une séquence à l'autre. Nous verrons par la suite par l'approche acyclique et le séquençage haut débit (section Introduction-**10.1.4**) qu'il existe une corrélation entre représentativité et affinité d'une séquence si l'on part d'une population homogène et qu'on n'effectue pas d'amplification.

Les séquençages par des approches haut-débit permettent d'explorer de manière extrêmement plus étendue la diversité au sein des populations des sous-librairies. Ils permettent d'accéder aux séquences de tous les cycles effectués et donc voir l'enrichissement individuel de chaque molécule ou de chaque motif avec une meilleure valeur statistique à partir d'un échantillonnage très important. Cependant il n'existe pas encore de travaux permettant d'expliquer l'évolution des populations de séquence au cours d'un SELEX.

## 10.2 Approche haut-débit

Le développement des méthodes de séquençage à haut débit a permis de développer des approches innovantes de traitement des données de SELEX et l'identification d'aptamères après un nombre minimal de cycle grâce à la profondeur d'analyse de la population totale apportée par le nombre très important de séquences analysées. D'autres approches ont même été développées pour permettre d'identifier les séquences liantes et les motifs de liaison sans même effectuer de SELEX, après seulement une interaction de la banque avec la cible.

### 10.2.1 *Identification par le taux d'enrichissement :*

La méthode d'analyse permettant d'identifier les séquences affines par leur taux d'enrichissement d'un cycle à l'autre ou du premier au dernier cycle a été nommée QSAS (Quantitative Selection of Aptamers through Sequencing) (Cho et al. 2011). Elle a permis en 3 cycles de SELEX d'identifier des aptamères de haute affinité avec des Kd de l'ordre du bas nanomolaire par sélection en microfluidique d'aptamères anti-PDGF-BB. Le taux d'enrichissement consiste simplement à calculer par quel facteur la fréquence d'une séquence a été multipliée entre deux cycles suivis ou entre le début et la fin du SELEX. Il a été démontré que ce ne sont pas nécessairement les séquences les plus abondantes qui ont le meilleur taux d'enrichissement. Les 3 séquences avec le meilleur taux d'enrichissement ont des Kd compris entre 2,5 et 2,7 nM pour le PDGF-BB alors que la séquence la plus abondante a un Kd de « seulement » 47,6 nM.

### 10.2.2 *Classification par polymorphisme en clusters :*

L'approche la plus basique pour rechercher des familles d'oligonucléotides est de se baser sur leur séquence stricte et procéder par un alignement multiple. Ceci peut permettre d'obtenir les distances d'édition entre les séquences, à savoir leur

proximité. Deux séquences possédant une distance d'édition  $ED=1$  seront différentes de seulement 1 évènement de substitution, de délétion ou d'insertion. Des arbres phylogénétiques peuvent ensuite être établis et permettre de visualiser la diversité mais aussi l'occurrence de chaque cluster de séquences proches (Ditzler et al. 2012; Thiel et al. 2012).

### 10.2.3 *Classification structurale en clusters :*

Deux groupes se sont plus particulièrement penché sur les familles structurales que l'on peut rencontrer lors d'un SELEX plutôt que sur les homologies de séquences (Thiel et al. 2011; Thiel et al. 2012; Ditzler et al. 2012). Deux travaux récents se sont intéressés aux séquences sélectionnées pour leur apparenté de séquence mais également pour les convergences structurales qui peuvent apparaître au cours de la sélection. Le postulat de départ est que les aptamères sont sélectionnés pour leur capacité structurale à reconnaître la cible. Le programme RNAfold a été utilisé pour générer la structure la plus stable correspondant à chaque séquence et un arbre de distance a été construit pour rendre compte des parentés structurales (Thiel et al. 2012). Le programme RNAalifold a été utilisé pour générer les structures prédites pour chaque cluster de séquences apparentés par leurs homologies. Puis les structures d'environ 5 000 clusters sont comparées pour créer des groupes d'homologie structurale.

### 10.2.4 *Identification acyclique d'aptamères :*

Quand chaque séquence n'est représentée qu'une seule fois dans l'échantillon d'oligonucléotides utilisé pour le premier cycle de SELEX, un enrichissement sur plusieurs cycles est impératif avant qu'un aptamère puisse être identifié par le nombre de ses représentants. En revanche, si la librairie de départ contient de multiples fois chaque séquence, il est possible d'identifier les séquences liantes par simple comptage après une seule interaction avec la cible. Voici l'idée de départ expérimentée par Gillian Kupakuwana pour la sélection acyclique d'aptamères ciblant la thrombine. Ils ont utilisé une librairie de faible complexité avec une région dégénérée sur 15 nucléotides ( $1.10^9$  molécules différentes) avec 56 000 représentants de chaque séquence dans les 100 pmoles utilisées pour la sélection (Kupakuwana et al. 2011). L'analyse de la population de séquences sélectionnée par séquençage haut débit (2 millions de séquences) a permis d'identifier des aptamères

de haute affinité parmi les séquences présentant le plus grand nombre de copies. De plus, il a été clairement mis en évidence qu'il y avait une corrélation directe entre le nombre de fois où la séquence a été comptée et son affinité déterminée par résonance plasmonique de surface. Les calculs théoriques et des expériences préliminaires suggèrent que l'identification d'aptamères par la méthode acyclique peut se faire sur des bibliothèques allant jusqu'à 22 et 23 nucléotides dégénérés. Ainsi, l'exploration de 25 nmoles de bibliothèque de départ permet d'avoir respectivement 860 et 210 représentants de chaque séquence. Ce nombre de représentants est suffisant pour permettre de discriminer les séquences liantes des séquences non spécifiques après leur élution de la cible.

#### 10.2.5 *Identification par analyse des k-mer :*

L'approche ASKAS (Hoon et al. 2011) (Aptamer Selection by K-mer Analysis of Sequence) permet l'identification de motifs conférant une haute affinité pour la cible sans l'utilisation du SELEX ni d'une bibliothèque sur-représentée comme décrit dans l'approche dite acyclique de Kupakuwana (Kupakuwana et al. 2011). Elle repose sur l'analyse comparative poussée des séquences obtenues après seulement une sélection positive. La cible protéique thrombine a été mise en interaction avec  $10^{12}$  séquences de la bibliothèque, d'une diversité théorique de  $7 \cdot 10^{19}$  séquences ( $N=33$ ), et 6 000 séquences d'un aptamère anti-thrombine connu servant de contrôle interne à la sélection. Les 11,5 millions de molécules séquencées par la technologie Illumina ont été traitées à l'aide du logiciel Tallymer pour étudier la présence de k-mer. Il a permis de rechercher les identités dans les différentes séquences pour des k-mer ayant des longueurs allant de  $k=33$  à  $k=15$ . Les différents k-mers rencontrés sont comptés et les 10 motifs de chaque longueur  $k$  les plus représentés sont sélectionnés pour des analyses plus poussées. De manière prévisible, plus  $k$  diminue plus le nombre de séquences correspondant au motif considéré est importante. Mais de manière intéressante, alors que pour des longueurs de motif allant de 20 à 16 nucléotides, les 10 motifs les plus représentés sont comptés en moyenne de 32 à 36 fois, un bond d'occurrence est observé pour les k-mers de longueur 15 avec une occurrence moyenne de 73,9 fois. Parmi les séquences formant les tops motifs de 15 et 16 nucléotides, les cinq motifs les plus représentés sont analysés pour leur liaison à la thrombine par résonance plasmonique de surface. Sur les 10 motifs étudiés, 9 ont montré des valeurs de  $K_d$  pour la thrombine allant du rang de la dizaine de

nanomolaire au micromolaire. La séquence la plus affine ayant déjà été identifiée par Bock et al. (Bock et al. 1992). Les affinités des aptamères ainsi identifiés sont comparables à celles obtenues par de multiples cycles de SELEX. Cette étude donne également des pistes intéressantes pour l'analyse des séquences de par l'étude de l'enrichissement en un seul cycle des séquences affines à partir d'une population homogène (le séquençage de la librairie le prouve). L'aptamère témoin a été séquencé 90 fois dans la librairie de départ (sur 15 millions de séquences lues) et 5925 fois après sélection positive (sur 11,5 millions de lectures), montrant son enrichissement au sein de la population par la sélection positive. Parmi les k-mer sélectionnés à partir de la librairie, le nombre de lectures lors du séquençage n'est pas corrélé avec l'affinité observée. La limitation de la technique ASKAS est commune à toutes les analyses de populations, à savoir la représentativité. Quand la distance du k-mer augmente, le nombre de séquences correspondantes au motif diminue jusqu'à ce qu'il soit noyé dans le bruit de fond. Il sera donc difficile d'identifier des aptamères de grande taille par cette technique.

## 11 Caractérisation et Optimisation des Aptamères

Une fois les données de séquençage traitées, il convient de définir si les candidats identifiés sont des bel et bien des aptamères. Pour cela il faut déterminer leur capacité de liaison à la cible et si possible définir leur affinité. D'autres caractéristiques souhaitées peuvent être établies, la capacité d'inhibition d'une cible par exemple. Des optimisations peuvent ensuite être effectuées sur les aptamères identifiés par raccourcissement de la séquence au seul motif de reconnaissance de la cible et/ou l'incorporation de modifications. Un exemple de démarche complète de caractérisation et d'optimisation est présenté dans un article récent décrivant un aptamère contre le facteur du complément C5a (Hoehlig et al. 2013).

### 11.1 Caractérisation :

D'une manière générale, le système d'analyse utilisé est le même que celui ayant permis le partitionnement du SELEX. Une revue relativement récente décrit

certaines des techniques utilisées pour déterminer l'affinité entre un aptamère et une protéine pure en solution (Jing & Bowser 2011). Cependant des techniques d'analyse d'interaction différentes de celles utilisées pour le partitionnement sont parfois utilisées pour leur qualité informative et/ou leur sensibilité. C'est le cas de la résonance plasmonique de surface (SPR), la micro-IsoThermoCalorimétrie ( $\mu$ ITC), la micro-Thermophorèse (MST) ou encore la micro-Free Flow Electrophoresis (Micro-FFE).

Cette dernière technique est issue de l'optimisation d'un concept de séparation de molécules datant des années 1960 (l'électrophorèse en continue en milieu liquide qui servait initialement à séparer des organelles) par sa miniaturisation en dispositifs microfluidiques. Cette technique est passée de préparative à grande échelle à analytique à micro échelle par de constantes améliorations de pouvoir résolutif et de fabrication (Turgeon & Bowser 2009). La Micro-FFE étant un procédé microfluidique en flux continu, les deux partenaires peuvent être injectés séparément et leurs concentrations sont modifiées sous la forme d'un gradient continu. Elle permet de procéder de la même manière qu'en électrophorèse capillaire d'affinité avec l'observation de la formation du complexe comparée à un étalon interne mais en une seule expérimentation pour explorer en continu une gamme de concentrations. Cette technique est donc plus rapide puisque l'on peut obtenir la courbe de liaison comprenant 300 concentrations différentes en seulement 5 minutes (Turgeon & Fonslow 2010).

En ce qui concerne les Cell-SELEX, il est classique de déterminer l'affinité de liaison par FACS. Les candidats aptamères sont marqués de manière directe ou indirecte par une molécule fluorescente et l'intensité de fluorescence des cellules après incubation est comparée à celle en présence de la librairie naïve. De nombreux protocoles existent, chacun approprié à un type de cellule (adhérentes ou en suspension) ou de cible (membranaire, intracellulaire, protéique ou d'autre nature). Le FACS peut également être utilisé pour déterminer l'affinité d'une séquence pour une molécule isolée. Dans ce cas la molécule cible est fixée à des billes de polystyrène et l'intensité de fluorescence moyenne en présence du candidat marqué est comparée à celle de la librairie avant sélection (Martin et al. 2013).

Nous avons utilisé l'approche FACS pour déterminer l'affinité des séquences issues du Cell-SELEX, nous développeront la problématique de conserver la présence des protéines exprimée à la membrane lors du décrochage d'une lignée adhérente pour une analyse en cytométrie de flux (section Résultats-6.7.2).

## 11.2 Optimisation des aptamères identifiés :

### 11.2.1 *Etudes de tronquage :*

Un aptamère de pleine taille sélectionné contient en général 3 régions. La première sert à l'interaction directe avec la cible, elle mesure approximativement 10 à 20 nucléotides de long et possède une structure tertiaire. La seconde contient des nucléotides qui ne rentrent pas directement en contact avec la cible mais jouent un rôle important dans la formation de structures de la première partie. La troisième est constituée de nucléotides qui ne sont pas en contact avec la cible et ne participent pas non plus à la structuration pour l'interaction (Gold et al. 1995; Jayasena 1999). Cette troisième région est considérée comme inutile et il est souvent préférable de tronquer l'aptamère pour l'éliminer. Cette troncation des nucléotides non-essentiels peut entraîner une augmentation de l'affinité de l'aptamère pour sa cible probablement à cause d'un moindre encombrement stéréochimique (Zhou et al. 2010). Un aptamère plus court sera également plus facile et moins cher à faire synthétiser et aura une meilleure pénétration tissulaire (Hicke & Stephens 2000; Manimala et al. 2004).

Pour les aptamères ARN, le footprinting enzymatique à la RNase ou l'hydrolyse partielle ont été utilisés pour déterminer le site de liaison (Manimala et al. 2004; Hicke et al. 2001; Sayer et al. 2002; Legiewicz et al. 2005; Green et al. 1996). Concernant les aptamères ADN, la séquence minimale de liaison peut être définie par la fragmentation partielle en 5' ou en 3' de l'aptamère pleine taille lors de procédés de synthèse *in vitro*, puis la migration sur gel de séquençage des séquences retenues par la cible (Green et al. 1996).

L'approche tendant à se généraliser est basée sur l'utilisation de logiciels de prédiction de structures aidant à déterminer les nucléotides importants pour la structuration de l'aptamère. L'alignement multiple des séquences obtenues après séquençage par des logiciels tels que ClustalW permet de définir les similarités et de

créer des familles. Au sein d'une famille, de nombreuses répétitions sont en général observées (Iwagawa et al. 2012; Shangguan, Tang, et al. 2007). M-Fold est un logiciel très utilisé qui se base sur des algorithmes mathématiques pour trouver l'état d'appariement le plus stable d'un point de vue thermodynamique (Ohuchi et al. 2006). Les paramètres expérimentaux tels que la concentration saline et la température vont influencer sur la prédiction de la structure secondaire permettant de minimiser l'enthalpie libre ( $\Delta G$ ) par la formation de tiges et de boucles. D'autres paramètres thermodynamiques peuvent être définis tels que l'enthalpie ( $\Delta H$ ), l'entropie ( $\Delta S$ ) et la température de dénaturation ( $T_m$ ) (Zuker 2003). Le  $\Delta G$  le plus bas ne correspond pas nécessairement à la véritable structure de liaison à la cible car il est fréquent d'observer une restructuration induite par la liaison. D'un autre côté, les séquences d'une même famille devraient se lier à la cible avec une même structuration mais avec des affinités différentes. Il est donc plus important de retrouver via le logiciel de prédiction des structurations partagées par tous les membres de la famille que de comparer les différentes meilleures structurations de chacune des séquences. L'analyse informatique permet de déterminer les zones importantes pour la structuration de l'aptamère, les zones en 3' et en 5' ne servant pas à la structure prédite sont éliminées et l'aptamère tronqué est testé pour sa liaison à la cible (Iwagawa et al. 2012).

Un autre logiciel fréquemment utilisé est QGRS Mapper sur des séquences riches en G. Ce logiciel génère des données sur la composition et la distribution de structures en G-Quadruplex.

### 11.2.2 *Modifications chimiques pour applications*

Il est souvent nécessaire d'apporter des modifications chimiques aux aptamères caractérisés pour les adapter à l'utilisation que l'on souhaite en faire. L'incorporation de modifications peut entraîner un changement dans le repliement de l'aptamère ou même directement empêcher sa liaison à la cible par des encombrements stériques (Beyer et al. 2005). Cette étape peut donc nécessiter un long travail.

Clairance sanguine et demi-vie plasmatique. Un aptamère non modifié est rapidement éliminé de la circulation sanguine, avec une demi-vie de quelques minutes à quelques heures, essentiellement due à la dégradation par les nucléases

et l'élimination par les reins, conséquence du faible poids moléculaire des aptamères. Les applications des aptamères non-modifiés sont alors limitées à traiter les phénomènes transitoires comme la coagulation sanguine ou alors à traiter des organes où une administration locale est possible. Cette clairance rapide peut être un avantage pour des applications comme le diagnostic *in vivo* par imagerie. Un exemple est l'aptamère anti-tenascine en cours de développement par le laboratoire pharmaceutique Schering AG pour l'imagerie du cancer. De nombreuses modifications sont disponibles pour accroître la demi-vie plasmatique des aptamères jusqu'à l'échelle des jours voire des semaines.

Une approche élégante a été effectuée par Dihua Shangguan *et al.* sur la stabilisation de l'aptamère en tige-boucle *sgc8*, spécifique de cellules leucémiques. Ils ont réussi à accroître fortement la stabilité de l'aptamère dans du sérum de veau fœtal en remplaçant les nucléotides de l'extrémité de la tige par des LNA (Locked Nucleic Acids) et ainsi limiter la dégradation par des exonucléases en 5' et en 3'. Les nucléotides non-essentiels à la liaison au sein de la boucle ont été remplacés par des unités de polyéthylène-glycol, limitant fortement la digestion par les endonucléases (Shangguan, Tang, et al. 2007).

## 12 Les Aptamères comme Outils Thérapeutiques et Diagnostiques

### 12.1 La thérapie

Le pouvoir thérapeutique des aptamères a très vite été perçu dès lors que leur liaison à l'aptatope entraîne une perte de fonction de la cible. Ils peuvent alors agir en tant qu'inhibiteurs (Pastor et al. 2013). Par exemple l'aptamère sélectionné contre la reverse transcriptase de HIV-1 possède une structure pseudoknot qui interagit étroitement avec le site actif de la polymérase.

Comme pour le diagnostic, leur utilisation en thérapie nécessite d'introduire des modifications chimiques. La stabilité dans le sérum de l'aptamère ARN anti-bFGF a été augmentée d'un facteur 1 000 par l'incorporation de 2'aminopyrimidines. L'aptamère anti-VEGF 2'aminopyrimidine et 2'O-méthylpurine est stable plus de 17h

## Les Aptamères comme Outils Thérapeutiques et Diagnostiques

dans les urines. La relative petite taille des aptamères (6 à 30 kDa) vis-à-vis des anticorps et de leurs dérivés (30 à 150 kDa) leur confère une clairance sanguine plus rapide. Mais celle-ci peut être ralentie par la pegylation (greffage de polyéthylène glycol), par chargement dans des liposomes ou par 3' biotinylation.

Ces modifications chimiques ont permis de développer des aptamères stabilisés pour des injections intraveineuses ou sous-cutanées possédant une demi-vie sanguine de l'ordre de 6 à 12 heures. La chimie des oligonucléotides est un domaine actif qui permet la mise au point de nouvelles modifications stabilisatrices. Il est envisageable que cela aboutisse à des aptamères à longue durée de vie *in vivo* (à l'échelle du jour ou de la semaine). Enfin, des études montrent qu'un aptamère ADN non modifié peut subsister plus de 6 jours dans du sérum. C'est une durée supérieure à celle nécessaire pour des applications *in vitro* comme *in vivo*.

Les aptamères ARN et ADN utilisés en essais cliniques sont habituellement modifiés en vue d'optimiser leurs paramètres pharmacodynamiques et pharmacocinétiques. Toutes les études menées sur les effets toxiques des aptamères en utilisation clinique ont à ce jour été négatives.

Leur absence d'effets secondaires laisse présager que les doses injectées lors d'une thérapie ne présentent pas de danger. De plus les aptamères sont décrits comme ne présentant pas d'immunogénicité, ni de potentiel d'activation du complément, ni d'effet anticoagulant. Il serait donc possible d'administrer des doses répétées au même patient. Cependant, une étude récente montre que l'administration d'une librairie d'aptamères peut induire un changement significatif dans la régulation de transcrits avec notamment des effets importants sur CCL8, CXCL10, CCL7 et CXCL11, impliqués dans la réponse immune et inflammatoire (Avci-Adali et al. 2013). Enfin, les aptamères possèdent des « antidotes » naturels que sont leurs séquences complémentaires. Cet effet antidote a pu être testé sur le facteur de coagulation IX.

Le premier médicament basé sur un aptamère a été approuvé en 2004 par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis pour le traitement de la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA). Il s'agit d'un aptamère ARN 2'Fluoropyrimidine et 2'O-méthylpurine pégylé qui cible le facteur de croissance

vasculaire VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) nommé Pegaptanib et commercialisé sous le nom de Macugen. En complément au Macugen, un aptamère ADN ciblant le facteur de croissance PDGF-B (Platelet-Derived Growth Factor-B) a été proposé pour le traitement de la DMLA exudative. Le premier aptamère ADN à passer les phases I et II des essais cliniques est l'aptamère AS-1411 anti-nucléoline pour un traitement anti-cancéreux. Parmi les aptamères actuellement en phase d'essais cliniques, certains ciblent des facteurs de coagulation. Un aptamère ADN appelé ARC1779 cible le domaine A1 du facteur de von Willebrand et inhibe sa liaison aux récepteurs de la glycoprotéine Ib sur les plaquettes. Le Nu172, un aptamère ADN anti-thrombine, possède des effets anticoagulants. Les 2 spiegelmers NOX-A12 et NOX-E36 sont actuellement en phase d'étude clinique pour le traitement de tumeurs hématologiques et du diabète de type 2.

### 12.2 Diagnostic *in vitro*

Les anticorps servent à une très grande variété d'applications basées sur la reconnaissance moléculaire de leur cible. Ils sont très utilisés dans le cadre de diagnostics cliniques malgré leurs limites. La production d'anticorps se fait chez l'animal via l'induction d'une réponse immunitaire vis-à-vis de la cible injectée or cette réaction ne peut pas se faire si la cible est trop similaire à des molécules endogènes. Il est également difficile d'obtenir des anticorps contre des molécules toxiques pour l'animal hôte. La production d'anticorps polyclonaux tend à varier d'un échantillon à l'autre et alors que les anticorps monoclonaux permettent de surpasser ce problème, ils sont chers et difficiles à produire. D'autre part les anticorps sont sensibles aux conditions de stockage, leur dénaturation est irréversible et leurs paramètres cinétiques de liaisons ne peuvent pas être modifiés à l'heure actuelle.

Les aptamères présentent de nombreux avantages vis-à-vis des anticorps pour une utilisation dans des systèmes de biosenseurs. La chimie des acides nucléiques est riche et permet d'incorporer facilement de nombreux types de modification quand la modification d'anticorps est complexe et coûteuse.

La première utilisation d'aptamères dans un biosenseur de type ELONA (Enzyme-Linked Oligo Nucleotide Assay) - équivalent oligonucléotidique de l'ELISA - a ouvert la voie aux aptamères pour concurrencer les anticorps dans le domaine bioanalytique. Cependant, les tests réalisés sur plusieurs aptamères révèlent que

## Les Aptamères comme Outils Thérapeutiques et Diagnostiques

chaque aptamère nécessite des optimisations individuelles. Contrairement aux anticorps dans l'ELISA, il ne semble pas exister de paramètres optimaux universels pour l'utilisation d'aptamères en ELONA.

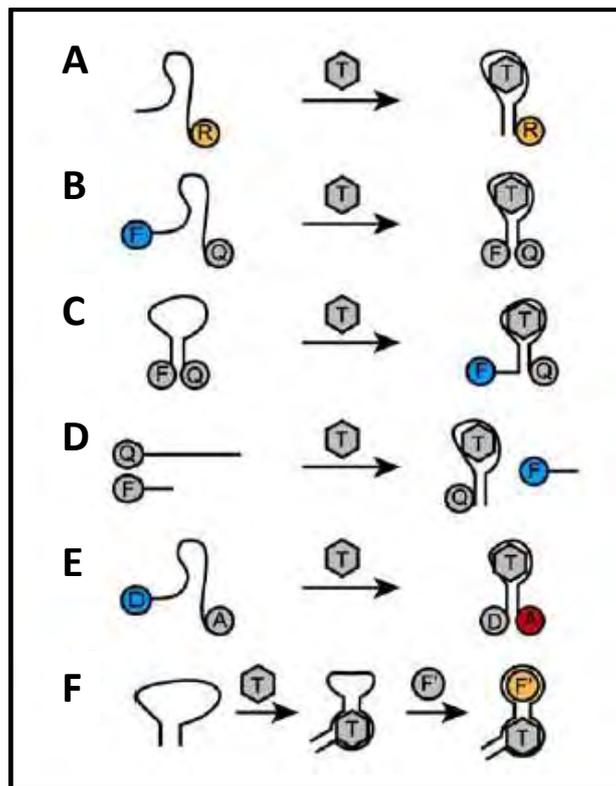
Les aptamères obtenus à partir de Cell-SELEX et qui ciblent des composés extra-membranaires peuvent être utilisés afin de différencier des types cellulaires au sein d'un échantillon biologique (Herr et al. 2006; Shangguan et al. 2006), comme des cellules tumorales vis-à-vis de cellules saines (Xu et al. 2009) et ainsi faciliter le diagnostic.

### 12.3 Diagnostic par imagerie

Les aptamères sont considérés comme une alternative de choix aux anticorps et peptides pour l'imagerie (Ferreira et al. 2008; Borbas et al. 2007; Missailidis & Perkins 2007; Hesselberth et al. 2000; Cibiél et al. 2012). Le premier aptamère utilisé en imagerie est un aptamère anti-élastase humaine marqué au  $^{99m}\text{Tc}$  pour visualiser *in vivo* les sites inflammatoires (Charlton et al. 1997). Le  $^{99m}\text{Tc}$  est un radionucléide émettant un rayonnement gamma possédant une demi-vie de 6 heures et un spectre d'émission idéal pour l'imagerie. Les aptamères ont montré de meilleurs *ratios* signal/bruit en un temps plus court que les Immunoglobulines G (Famulok & Mayer 1999). Le développement récent des techniques d'imagerie photonique et la multiplication des agents fluorescents disponibles laissent entrevoir la possibilité de limiter l'utilisation des radioisotopes.

Les aptamères ont également permis de développer des techniques inédites de détection de molécules biologiques telles que les balises aptamères dont les variants développés sont de plus en plus nombreux. La balise aptamère est particulièrement intéressante puisqu'elle ne nécessite que l'adjonction de l'échantillon pour donner un résultat quantitatif en quelques minutes. La plupart des modèles de balise utilisent le changement conformationnel observé pour les oligonucléotides lorsqu'ils sont mis en contact avec leur cible. Ces balises ont de forts *ratios* signal/bruit. Ces sondes sont la plupart du temps basées sur les propriétés physicochimiques de la fluorescence avec du quenching, du FRET (Förster resonance energy transfer) ou une propriété d'induction de fluorescence (Wang & Ray 2012). Dans le quenching de fluorescence, la lumière émise par un fluorophore donneur est perdue par l'absorption d'un quencher à proximité (**Figure**

**12B, C et D).** Dans le FRET, la lumière émise par un fluorophore donneur est utilisée pour exciter un fluorophore accepteur à proximité et suivre ainsi à la fois l'émission des deux fluorophores donneur et accepteur (**Figure 12E**). Le quenching de fluorescence et le FRET sont des procédés dépendants de la distance entre les deux partenaires. Une sonde aptamère peut être conçue de manière à ce que la distance entre le fluorophore donneur et le fluorophore accepteur/quencher soit modifiée par la liaison à la cible. Le changement de fluorescence dû au changement de distance, soit intramoléculaire soit intermoléculaire permet de rendre compte de la liaison de l'aptamère à sa cible. Pour les propriétés d'induction de fluorescence, un fluorigène non fluorescent est modifié en composé fluorescent par la liaison de l'aptamère et le changement de microenvironnement ou de propriétés chimiques du fluorigène qu'elle induit (**Figure 12F**). D'autres approches comme la complémentation de fluorescence



ont également été utilisées.

**Figure 12 : Sondes aptamères pour l'imagerie moléculaire.** Le signal de la sonde peut être émis soit par un conjugué rapporteur directement couplé à la sonde (**A**) ou à travers divers mécanismes incluant le quenching de fluorescence (**B**), le déquenching (**C et D**), le FRET (**E**) ou l'utilisation d'un fluorigène (**F**). A, accepteur ;

**Les Aptamères comme Outils Thérapeutiques et Diagnostiques**

*D, donneur ; F, fluorophore, F', fluorigène ; Q, quencher ; R, rapporteur ; T, cible.  
(Figure adaptée de (Wang & Ray 2012))*

Le diagnostic par imagerie constitue un volet important parmi les méthodes diagnostiques. Les modalités d'imagerie se développent sans cesse et les études utilisant des aptamères comme sondes sont de plus en plus nombreuses. Notre équipe participant activement à la plateforme d'imagerie cellulaire T.R.I. (Toulouse-Réseau-Imagerie) sur la thématique de l'imagerie de fluorescence, nous avons participé à la rédaction d'une revue dans laquelle les études récentes utilisant des sondes aptamères sont référencées.

# Fluorescence Imaging in Cancerology

Elisabeth Bellard<sup>1,2,\*</sup>, Sophie Chabot<sup>1,2</sup>, Vincent Ecochard<sup>1,2</sup>, Olivier Martinez<sup>1,2</sup>, Aurelie Paganin-Gioanni<sup>1,2</sup>, Sandrine Pelofy<sup>1,2</sup>, Laurent Paquereau<sup>1,2</sup>, Marie-Pierre Rols<sup>1,2</sup>, Bettina Couderc<sup>2,3</sup>, Justin Teissie<sup>1,2</sup> and Muriel Golzio<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>CNRS/IPBS (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale); 205 route de Narbonne BP64182, F-31077 Toulouse, France; <sup>2</sup>Université de Toulouse; UPS; IPBS; F-31077 Toulouse, France; <sup>3</sup>EA4553, Institut Claudius Regaud, Toulouse, France

**Abstract:** Fluorescence imaging is nowadays a powerful tool for laboratory animal studies in oncology. This emerging technology is in full development and is becoming a complementary tool in clinics for specific cancer diagnosis. For now, it allows detection with a high spatio-temporal resolution of specific signals like tumor markers in small animals. Different ways of *in vivo* imaging exist: epifluorescence macroscopy, intravital imaging to visualize molecular processes combined or not with multiphoton excitation and fluorescence tomography to spatially detect deeper cellular phenomena. These techniques are impaired by the tissue optical properties: auto-fluorescence, photon scattering in tissues and by limited depth penetration of the excitation beam in tissues. To overcome these limits, scientists are developing spectral imaging, far-red imaging technologies and associated dyes to observe tumor cells biology over longer periods, on larger volumes and on a higher number of organs, thus improving the knowledge in tumor pathophysiology.

A challenge in oncology is to improve early detection and prevention using novel targeted cancer diagnostics. Detection requests specific recognition. Tumor markers have to be ideally present on the surface of cancer cells. Their targeting with ligands coupled to imaging agents make them visible/detectable.

In this review, after a short introduction on *in vivo* fluorescence imaging theories and a description of the different existing modalities, we will focus on the recent outcome of basic studies in the design of new probes and devices used to detect tumor cells.

**Keywords:** Fluorescence microscopy, small animal, probe, tumor marker, intravital, oncology.

## STATE OF THE ART

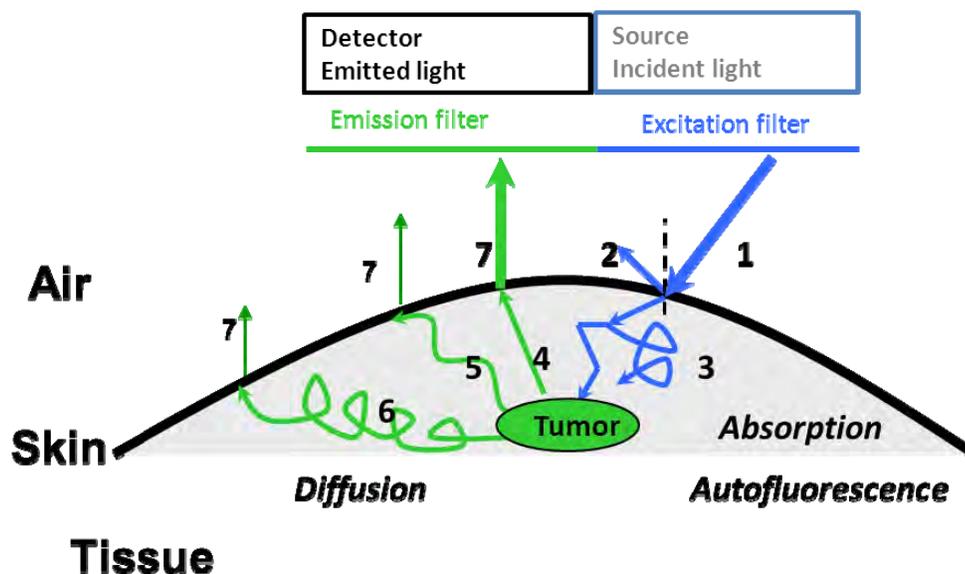
Small animal fluorescence imaging technology is in a state of rapid evolution because of its easiness and the quality of the information obtained. Fluorescence imaging consists in detecting proteins into living animals based on: target activity which implies the conversion towards a fluorescent product, fluorescently labeled-antibody or aptamer, or directly by intrinsic fluorescence [1-3]. This technology allows time-course studies on the same animal reducing the number of animals needed for statistical analysis. Moreover, each animal is its own control allowing quantitative following up [4, 5]. Information obtained by relative fluorescence intensity is quantitative, spatially defined and accessible over time if a specific indicator is used. Fluorescence imaging has become an essential tool to study molecular and cellular mechanisms in pathological models such as cancers and neurological disorders [6-11]. Researchers can follow processes like immune cells trafficking to inflamed sites, tumors spreading or shrinking, angiogenesis. For tumor targeting,

biological probes need to be labeled with fluorescent agents by direct methods or by the way of molecular assemblies and to couple this fluorescent platform to the appropriate ligand or marker of the target. Then this whole complex can be injected into the animal for imaging the tumor with a whole-animal imaging instrument.

Specific visualization of carcinogenesis or established tumor cells offers opportunities to guide the surgery and/or monitor the therapy response. In clinic, radio-imaging uses contrast agents Indium-111 and Technetium-99 coupled to antibodies to target prostate [12, 13], colorectal [14, 15], ovarian or small-cell lung cancers [16]. These radioelement-based technologies are powerful tools for detection and therapy of cancers but they cannot be used during surgery. Fluorescence imaging is more user-friendly and provides on-line information [1, 2]. Therefore, fluorescence imaging agents which allow fast detection with a high spatio-temporal resolution can increase detection of the edge of the primary tumor and metastasis and therefore help tissue resection by the surgeon [17].

In this review, we first describe the fluorescence imaging theory with its key strengths and limitations, and present an overview of the different existing modalities in fluorescence imaging for *in vivo* applications. We then focus on the dif-

\*Address correspondence to these authors at the CNRS; Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, 205 route de Narbonne, BP 64182, F-31077 Toulouse, France; Tel: +33 561 175 813; E-mails: [muriel.golzio@ipbs.fr](mailto:muriel.golzio@ipbs.fr); [elisabeth.bellard@ipbs.fr](mailto:elisabeth.bellard@ipbs.fr)



**Fig. (1). Principle of epi-illumination fluorescence imaging: complex trajectories in tissue.** The excitation beam (1) is selected through the excitation filter at the optimal excitation wavelength of the fluorophore. This light is focused on the animal. A part of this light is reflected (2) on the surface of the skin while the main part crosses the skin and reaches its target within the tumor after being or not scattered by the tissue properties (3). The fluorophore emits ballistic photons (4), quasi-ballistic photons (5) and diffused photons (6). Only photons going out of the tissue (7) are detected by the detector equipped with an emission filter corresponding to the fluorophore maximum emission. Excitation light absorbed by the tissue may also generate emission of photons coming from intrinsic fluorophore that participate to the autofluorescence signal.

ferent partners needed to visualize tumor cells by fluorescence imaging: fluorescent markers and complex molecular assemblies, tumor targets and the associated biological probes. Finally, we discuss about the commercialized and developed systems for *in vivo* imaging, the recent advances in intravital microscopy as well as the relevant applications with these devices in cancer research.

## 1. *IN VIVO* FLUORESCENCE IMAGING: THEORY, KEY STRENGTHS AND LIMITATIONS

### 1.1. Principle

Fluorescence is a 2 wavelengths spectroscopy: the excitation and the emission [18]. The incident light illuminates the fluorophore with one given wavelength that in return emits photons of longer wavelengths. Thus, fluorescence imaging needs a light source to excite the fluorophore within the targeted tissue, combined with a spectral filter to select the excitation wavelength, a second filter that only allows passage of the emitted fluorescence and a detector that detects the signal (Fig. 1). This technology is close to epi-illumination microscope but *in vivo* observation requires specificities as described below.

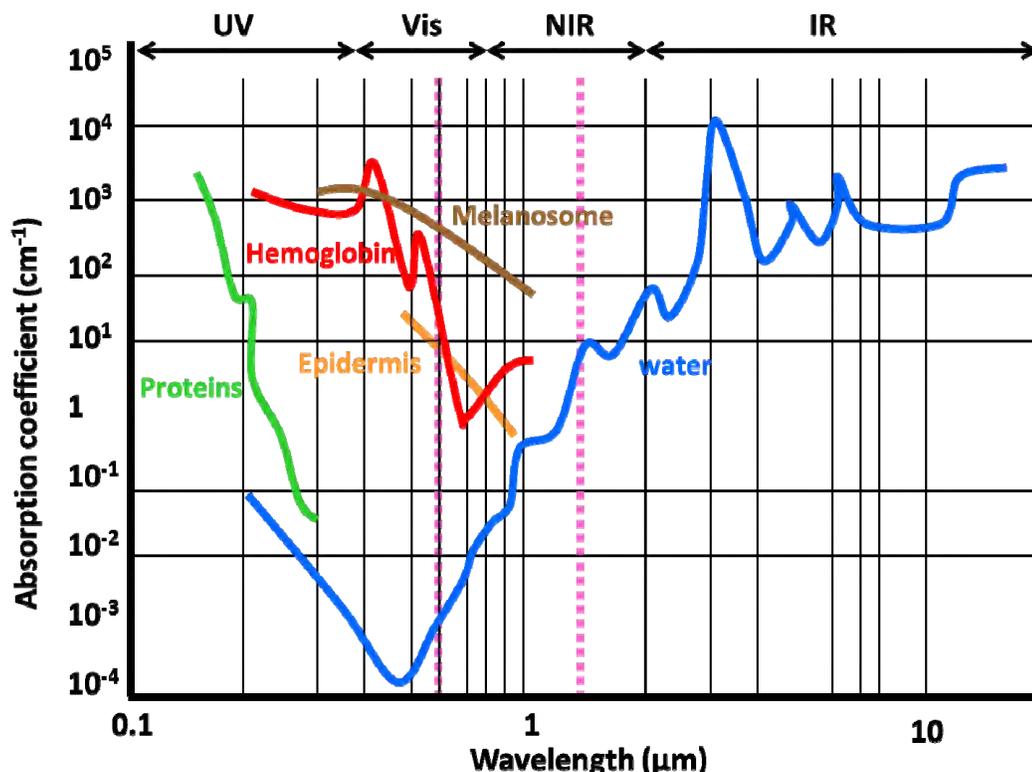
### 1.2. Tissue Properties, Autofluorescence

For tissue fluorescence imaging, it is necessary to take into account five important parameters: reflection, absorption, refraction, autofluorescence background and diffusion of photons emitted by the fluorochrome. Indeed, light has to travel into the animal to excite the targeted tissue and to go out again to be detected, getting scattered and absorbed in both directions. Furthermore, the skin is also an obstacle because the light is partially reflected by this barrier. Reflec-

tion brings a loss in the penetration of the excitation light and detection of the emission (Fig. 1).

In tissues, different endogenous microscopic components, from small and macro molecules to larger structures such as organelles and cell membranes, strongly absorb the incident (or emitted) light (Fig. 2). Absorption due to endogenous microscopic components is very strong below 460 nm and remains important up to 580 nm. Furthermore, hemoglobin absorbs light in the visible range (from 400 to 470 nm). Thus, only a weak penetration in the tissue can be obtained. The same problem is of course present if emission is in the same wavelength range as excitation. Thus absorption which limits light penetration to a few hundred micrometers is a major hurdle for the near UV and visible part of the spectrum. As the absorption coefficient ( $\text{cm}^{-1}$ ) decreases when the wavelength increases, a deeper penetration (several centimeters) is obtained when working in the near infrared (NIR) part of the spectrum  $> 600$  nm [19]. However, above 1100 nm, water strongly absorbs the light. Thus, the optimal tissue optical window is comprised between 600 nm and 1100 nm even though the scattering remains high, due to refractive index mismatches between the different cellular components and fluids. It acts on excitation and emission and induces blurring in fluorescence images of deep targets. This is a limit in the spatial definition for imaging of animals [17].

Finally, light absorption by endogenous fluorochromes can result in light emission, the so called autofluorescence of the tissue. This phenomenon is partly due to the oxidized forms of riboflavin, NADH and flavin co-enzymes reduced inside cells [20, 21]. Molecules like lipofuscin and ceroides or components of the skin, such as collagen and melanin, also contribute to this effect. Autofluorescence is also a con-



**Fig. (2).** Absorption spectra of different molecules present in biological tissues. The optical window comprised between 600-1100 nm (dashed lines) is ideally sought in fluorescence imaging of small animals. Hemoglobin and water strongly absorb light below and above this optical window respectively.

sequence of food that contains chlorophyll [22, 23]. Tissue autofluorescence is mainly present in the UV and visible range of the spectrum and negligible in the NIR.

As a conclusion, working in the NIR bandwidth offers less photon absorption, a limited light scattering and a reduced tissue autofluorescence enabling a deeper visualization. However, an accurate quantitative and spatially resolved detection by an *in vivo* optical method is still hampered by the optical properties of biological tissues. Taking into account these limitations, optimized imaging modalities and relevant biological reporter probes has been developed for *in vivo* fluorescence imaging.

## 2. IMAGING MODALITIES

We described above physical phenomena that impair fluorescence imaging detection and spatial resolution. Together, these characteristics led to the following problem: "How to detect a weak signal in a turbid environment?" Technological improvements have been made for illumination lights (tunable lasers, laser diodes, light emitted diodes (LED)). Sensitivity and spatio-temporal resolution have been increased with the development of cooled "Charge-Coupled Device" (CCD) cameras, intensified CCD's, electron multiplication CCD's (EMCCD), scientific complementary metal oxide semiconductor (sCMOS) cameras, avalanches photodiodes (APD's), photomultiplier tubes (PMT's) and gallium arsenide phosphide (GaAsP) detector arrays [24]. The following paragraphs describe, technically, the different existing modalities for small animal fluorescence imaging.

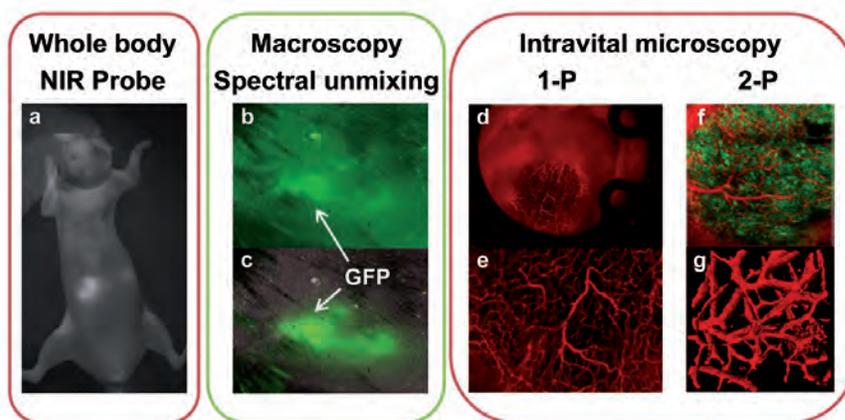
### 2.1. FRI (Fluorescence Reflectance Imaging) Based-systems

#### Whole-body Fluorescence Imaging

Whole-body imaging gives access to relative quantitative fluorescent signal with a "crude" topological definition over a long period. The illumination of the animal is performed by a broad-beam source covering the entire animal. The fluorescent signal is detected in reflectance mode by a cooled CCD camera. To get deeper into tissue, the use of far red excitation light and detector suitable for NIR fluorescence detection is advised (Fig. 3a). This epi-illumination technology is non-invasive and allows time-course studies. Moreover, its low cost renders this technology particularly attractive in terms of quality of the obtained information / price ratio. In the visible spectrum, techniques of dynamic contrast-enhanced imaging [25] or spectral unmixing have been integrated in the systems to remove autofluorescence signal and thus increase the sensitivity (signal/noise ratio). Spectral imaging appears well adapted to eliminate pixel by pixel autofluorescence [26].

#### Fluorescence Macroscopy

For fluorescence macroscopy, illumination of the animal is performed on a small part of the animal depending on the magnification. With this epi-illumination technology, the observation window is around few cm<sup>2</sup> in surface but only few mm in thickness (Figs. 3b and c). Optical improvements have increased spatial resolution until reaching cellular size. The fluorescent signal is detected in reflectance mode by a cooled



**Fig. (3). Epi-illumination Imaging Modalities.** Whole-body fluorescence imaging: (a) SKOV-3 ovarian tumors were observed 3 weeks post injection and visualized 24 h after AngioStamp<sup>®</sup> injection by using Fluobeam<sup>®</sup>, a real-time imaging camera in the 690–700 nm spectral window. AngioStamp<sup>®</sup> specifically highlights human primary tumors in nude mice 24 h after intravenous injection (10 nmol) [169].

Macroscopy fluorescence imaging: (b) Detection of B16F10 cells constitutively expressing GFP 48h after injection (500 000 cells) by fluorescence macroscopy (macrofluvo, Leica) coupled with cooled CCD camera (Coolsnap HQ Roper) and Leica GFP2 filter set (exc : 490/20, em : 510/40). (c) Detection of the tumor cells and autofluorescence at the same location by fluorescence macroscopy (macrofluvo, Leica) coupled with cooled CCD camera (Nuance 2, CRI Lot Oriol) and Leica GFP1 filter set (exc : 490/20, em : LP510) and spectral unmixing. GFP signal is then visualized and can be quantified.

Intravital microscopy : (d) B16F10 cells are implanted in a dorsal window chamber. Blood vessels are labeled by rhodamine dextran in the blood stream and visualized under the macrofluvo (x10), (e) at higher magnification (x45). (f) B16F10 cells constitutively expressing GFP are implanted in a dorsal window chamber in order to observe the organization of the tumor cells and the tumor angiogenesis. Blood vessels are labeled by rhodamine dextran in the blood stream and visualized under the 7MP (Zeiss) equipped with pulsed femto-second Titane-Saphir laser (Coherent, Chameleon Ultra II) at 800 nm to visualize the cells (BP 495-555) and the tumor blood vessels (BP 565-610). (g) surface detection of the tumor blood vessel network after Imaris software analysis.

CCD camera combined with filters to assure spectral analysis indispensable for removing auto-fluorescence when working in the visible range as described above (Figs. 3b and c).

### Monophoton Intravital Microscopy

For monophoton intravital microscopy (IVM), surgery is needed either to have direct access to the target tissue or to graft a dorsal [27], mammary [9, 28] or cranial [29] window chamber (Figs. 3d and e). These observation window grafts are well tolerated and animals show no signs of discomfort or changes in sleeping or feeding behaviors. By removing the skin, the optical barriers such as absorption, reflection, background autofluorescence are knocked down. In monophoton IVM, high magnification objectives are used because of the short working distance. Detection is assured by cooled CCD camera or intensified CCD camera if short exposition time is needed (for dynamic acquisition). This approach is technically difficult and more aggressive for the animal than whole-body but gives access to the cellular level within a high resolution and so for several days [8, 30, 31].

IVM can also be performed without surgery by the way of endomicroscopy or confocal laser endomicroscopy (CLE) [32]. This technique allows high resolution imaging of targeted tissue *in vivo* and in real time during endoscopy. Infrared video-endomicroscopy consists of an infrared endoscope equipped with a broadband light source with excitation and emission filters and an intensified CCD camera [33]. The confocal technology enables *in vivo* observation of an optical section with better resolution by excluding light from planes above and below the plane of interest [34]. Associated with topical or systemic optical contrast agents, CLE allows 3-

dimensional (3D) observations at subcellular level. The penetration depth is limited (0.25 mm) nevertheless it can bypass the need for small biopsies in certain cases.

### Multiphoton Intravital Microscopy

As previously explained, visible light diffusion from the tissue decreases the light intensity detected in the focal plane. Because of the use of NIR wavelengths, multiphoton microscopy enables spatial resolution of deeper light signals in tissue (Fig. 2) [35-37]. The physical principle is based on a focused high power pulsed laser. Pulsed low energy photons must simultaneously interact with the fluorophore to allow the sum of photon energies to generate excitation and to produce emission. The focal plane is the only location along the optical path where photons are dense enough. In consequence, the excitation is localized limiting the photobleaching and the phototoxicity. Using photons of low energy minimizes scattering in the tissue so the background signal is strongly suppressed and the out-of-focus absorption is eliminated allowing more of the excitation light photons to reach the desired area of observation [35-37]. Both effects lead to an increased penetration depth from 200  $\mu\text{m}$  to 600  $\mu\text{m}$  depending on the tissue that is observed.

Multiphoton microscopy can also be utilized to take advantage of other physical and optical properties of two photon interactions with tissue. Second harmonic generation (SHG) also depends on the interaction of two photons simultaneously with the target but without absorption of photons. Rather than producing a fluorescence excitation, the two photons interact simultaneously with a non-centrosymmetric target and produce a new photon with exactly twice the en-

ergy of the interacting photons [38-40]. Thus, SHG can capture biochemical information from intrinsic biological molecules. Collagen generates a strong SHG signal that is largely used for probing cancer biology.

In addition to the emission obtained by multiphoton excitation of fluorophores or intrinsic biological molecules, the fluorescence lifetime can also be measured using fluorescence lifetime imaging (FLIM). This parameter is independent of fluorophore concentration, highly correlated to molecular environment and thus can provide information about the features (benign or pathologic) of the observed tissue [41]. In addition to the pulsed source, FLIM requires very sensitive gated detectors to obtain measurements highly resolved in time.

To get rid of skin optical barriers [42, 43] and to have access to deep molecular and cellular processes into the brain [44], the skin [45], the liver [46], the kidney [47] and the tumor [48, 49], multiphoton microscopy can be combined with IVM. High resolution 3-dimensional (3D) images can be obtained with a stage or a motive objective (Figs. 3f and g). The implementation of optical parametric oscillators (OPOs) in multiphoton microscopy allows excitation in the IR range from 1050 until 1600 nm. It increases the penetration depth and allows the use of bright fluorescent proteins in the red and far-red spectrum, opening the possibilities for multicolor intravital microscopy with fluorescent proteins. One of the limitations of this technology is its high cost that hampered its accessibility. Furthermore, its complexity requires a highly qualified environment. The necessity for multiphoton to use high numerical aperture objectives and exogenous fluorescent agents limits the ability to investigate substantial tissue volumes or to probe dynamic changes over prolonged periods. Optical frequency domain imaging (OFDI), circumvents the technical limitations of multiphoton microscopy and does not necessitate contrast agents. In OFDI, an optical beam is focused into the tissue and reflected light is detected after interference with a reference beam. The amplitude and phase of the reflected signal as a function of time are then used to derive the optical scattering properties and thereby the tissue structure at different depths [6, 11].

## 2.2. Fluorescence Transmission Imaging (FTI) Based-system

### Fluorescence Tomography

Fluorescence molecular tomography (FMT) is an imaging modality that enables determination of 3D distribution of a fluorescent probe in tissues of live animal at any depth. To transilluminate biological tissue, this modality uses NIR light [50, 51]. This technology is based on a deconvolutional approach involving the diffuse propagation of photons in a turbid environment [51, 52]. The FMT devices generate the reconstruction of spatial information from images acquired at different observation angles. These images are obtained with a cold CCD after sequential frontal illumination [51, 52]. Then a mathematical formulation is used to describe photon propagation in tissues [52]. Finally, FMT leads to a quantitative 3D image of the animal with a spatial resolution and a depth of few millimeters order. The aim is to have spatial and quantitative information of fluorescent volumes in living

animal allowing the detection of metastasis. This modality is often combined with X-ray computational tomography imaging (CT) or magnetic resonance imaging (MRI) to provide an anatomic reference and to improve reconstruction accuracy [2, 53]

## 3. CANCER CELLS TARGETING FOR FLUORESCENCE IMAGING

Targeting tumor cells for fluorescence imaging can be achieved by coupling a fluorescent agent with biological probes (antibodies, aptamers, peptides or metabolites) that recognize specific tumor markers mainly expressed or over-expressed by tumor cells. The labeling of the biological probes can be done by directly coupling the fluorescent markers or through complex molecular assemblies (Table 1).

### 3.1. NIR Dyes and Imaging Molecular Assemblies

#### Organic Fluorophores

Different kinds of commercial organic fluorophores emitting in the NIR wavelength domain are available. The most communally used are cyanine [54], Alexa Fluor [55] and phthalocyanine and IRDye [56]. They can be grafted on any kind of molecules of interest such as nucleic acids, proteins or antibodies. They offer several advantages such as a weak photo-degradation, a weak toxicity, a small molecular weight and a functional group allowing their grafting. Their limit is a weak fluorescent quantum yield [54]. Therefore, multi-grafting of these molecules on "rafts" [57] or on dendrimers [58] is performed to increase the local number of emitters on the target. Company brand fluorophores are now on the market (DyLight Fluor family by Dyomics in collaboration with Thermo Fisher Scientific, KODAK X-SIGHT Large Stokes Shift Dyes and nanospheres, XenoLight CF by Caliper).

#### QDots

Commercially available quantum dots are promising competitors of organic probes for fluorescent imaging (Qdot<sup>®</sup> nanocrystals by Molecular probes, Quantum Dot Corporation Qtracker). Indeed, they have a strong fluorescent quantum yield [59], a weak sensibility to photobleaching and a strong stability. However, they show significant *in vivo* toxicity due to their chemical core (nanotoxicology) [60, 61]. Qdots are CdSe/ZnS core/shell nanocrystals [62], toxic to cells because of the release of Cd<sup>2+</sup> ions into the cellular environment [60, 63]. Studies have demonstrated that the surface functionalization plays the key role in nanoparticles toxicity [60, 64]. Thus, this problem has been partially overcome by coating Qdots with polymers, poly(ethylene glycol) (PEG), or other inert molecules [64]. *In vivo*, they are used with success with the two-photon microscopy technology [65].

#### Smart Probes

"Smart probes" or "smart sensors" are probes activated by an intracellular proteolytic reaction within the targeted tumor cells rendering the probes fluorescent. Probes are activated by proteases or intracellular reductases over-expressed in tumor cells (metalloproteinases MMP-2, cathepsins B and D, cysteine proteases, thioreductases) which cut lysine-lysine

**Table 1. Examples of Tumor Markers and Probes Used in Fluorescence Imaging**

Tumor markers	Probes	Fluorescence and platforms	Cancers	References
PSMA	Antibody	Quantum Dots-PEG, IndoCyanine Green	Prostate	[74, 92]
	Aptamer	Cy5-PLA NanoParticles		[162]
	YC-27 PSMA-inhibitor	IRDye800 Licor		[163]
CEA	Antibody	AlexaFluor488, Cyanine (DY-676), IR783-HSA NanoParticles	Colorectal, gastric, pancreatic, lung, breast	[73, 93, 94]
HER-2	Antibody	Quantum Dots, PAMAM + (x5) AlexaFluor488, IRDye800 Licor	Breast, gastric, ovarian carcinoma	[75, 80, 95]
	Affibody	IRDye800 Licor AlexaFluor680, Cyanine 5.5, SRfluor680, Dylight750, Quantum Dots800	Ovary, epidermoid carcinoma, gastric, breast	[99-105]
VEGFR	Antibody	IRDye800 Licor	Ovary, breast	[95, 96]
	VEGF <sub>121</sub>		Breast	[97]
EGFR	Antibody	Cyanine 5.5	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	[164]
Integrin $\alpha_v\beta_3$	RGD Peptide (c(RGDyK); RGD-4C (doubly cyclised RGD); c(RGDfK))	Quantum Dots705; PAMAM +(x3) AlexaFluor488; PAMAM +(x4) FITC; RAFT +(x2) Cyanine5, Cyanine 5.5	U87MG, brain, melanoma	[76, 85, 110, 124, 165]
$\beta$ -D-galactose receptor (lectin)	BSA / GSA	Rhodamine G	Ovary and adenocarcinoma	[111]
Glucose metabolism	2-deoxyGlucose	IRDye800 Licor	Glioma, prostate, epiderm, colorectal	[117, 118]
MMP-2	Chlorotoxin, Poly-L-Lysine-MPEG	Cyanine 5.5	Glioma, neuroectoderma, fibrosarcoma	[67, 68]
Protease activity	ACPPs	PAMAM+(x3)Cyanine 5	Breast, melanoma, fibrosarcoma	[122, 123]
Folate receptor	Folate	Quantum-Dots, FITC	Brain, ovary	[114-116, 166]
Mucine 1	Aptamer	Rhodamine B Quantum Dots-Doxorubicin	Brain, ovary	[112, 113]
Tumor associated glycoprotein-27	Antibody	IR783 HSA NanoParticles	Colon	[94]
CD-105	Antibody	IRDye800 Licor	Breast	[167]
SpermProtein17 (sp17)	Antibody	IndoCyanine Green	Hepatocellular carcinoma	[121]
p68	Aptamer	Cyanine 3	Intrahepatic colorectal metastases	[168]
Protein Tyrosine Kinase-7	Aptamer	Cyanine 5	Leukemia	[137]
Nucleolin	Aptamer	Magnetic fluorescence NanoParticles	C6 glioma cells	[138]
Unknown	CSNIDARAC peptide	FITC, Cyanine 7.5	Lung	[125]
	Aptamer	Cyanine 5	Ramos cells (Lymphoma)	[136]

or disulfide bonds of the complex and release the fluorophore [66]. These probes give an excellent signal-to-noise ratio because they are activated only when internalized in target cells.

ProSense probes developed by Weissleder (VisEn Medical, Inc., Woburn, MA) are polylysines labeled by non-fluorescent cyanines. When the probe is internalized into cells by endocytosis, the peptide link separating the cyanines (between lysines) is broken by the action of intracellular proteases such as cathepsins B or D or MMP-2, and fluorophores are released into the cells, which become fluorescent [67, 68].

Razkin *et al.* showed that the molecule RAFT-RGD-Cy5-SS-Q penetrates specifically in tumor cells and is activated once inside [66]. The complex consists of 4 RGD peptides specifically targeting the  $\alpha V\beta 3$  receptors over-expressed on the surface of cancer cells and of a quencher (Q) connected to a cyanine 5 (Cy5) *via* a disulfide bond. This bond is reduced by thioredoxin in the cytoplasm and the endosomes after internalization of the complex into the cells. In consequence, the quencher is spatially separated from the cyanine and the complex becomes fluorescent. The phenomenon of quenching can be obtained by combining two identical fluorophores but the rate of cleavage of the disulfide bond is weaker and the contrast obtained *in vivo* is much smaller [66].

Andreev *et al.* demonstrated that the peptide "pH low insertion peptide" (pHLIP) is able to insert into the lipid bilayer of the plasma membrane by forming an  $\alpha$  helix when the acidity increases in the extracellular matrix [69]. Insertion of the peptide in the cell membrane occurs at pH below 6.5. The C-terminal end of the complex is translocated into the cytoplasm. Two applications are then possible: targeted delivery of drugs in tumor cells and fluorescence imaging of these cells. Indeed, the extracellular matrices surrounding tumors or inflammation or infection sites are acidic environments compared with those surrounding healthy tissues. Andreev *et al.* grafted a disulfide bond linked to a fluorescent molecule to the C-terminal end of the peptide [70]. The fluorescent molecule is released into the cells after cleavage of the disulfide bond by thioredoxin. The peptide is effective for *in vivo* detection of tumor cells by non-invasive fluorescence imaging localizing specifically in tumor cells within 20 hours [70].

### Molecular Assemblies

Functionalization of fluorescent agents by coupling them with enzymatic ligands, antibodies or peptides enables their targeting to tumor cells [54, 71, 72]. Classically, tumor probes are bound to an organic fluorophore [54, 73] or quantum dot [74, 75] that has amine, carboxylic acid or thiol reactive groups. However, the number of reactive groups per probe is low. According to the protein size and the number of reactive groups, 4 to 10 fluorophores can be grafted per protein. In order to increase fluorescence signal of tumor probes and/or their specificity for tumor cells, molecules called "platforms" are used as a covalent support to several fluorophores and/or several probes (Table 1).

Quantum dots can also be used as "platforms" because they allow several connections with biological probes. This

has been proven by Cai *et al.* that grafted multiple RGD peptides onto a quantum dot [76] greatly increasing the specificity of the quantum dot for tumor cells.

The work of Jin *et al.* on the regioselectively addressable functionalized template RGD peptide (RAFT RGD) shows the specific labeling of tumor cells over-expressing integrin  $\alpha V\beta 3$  receptor [71]. This molecule is a deca-peptide accepting 4 cyclo-RGD peptides and one fluorochrome. It is necessary to have at least 4 RGD peptides *per* platform to specifically detect tumor cells *in vivo* [71].

Dendrimers are now experiencing their first major application as diagnostic tools when grafted with contrast agents [77, 78] or fluorochromes and targeting agents [79-81]. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers are used in imaging because they are water-soluble, biocompatible and biodegradable [82, 83]. They increase the sensitivity of detection because several imaging agents are bound per dendrimer. Furthermore, by increasing the number of biological probes by complex, it is possible in some cases to increase the specificity of the detection signal. A complex composed of a PAMAM dendrimer with multiple RGD peptides [84, 85] and several fluorochromes [81, 85] increases both the fluorescence signal of tumor probes and their specificity for tumor cells. Several studies using dendrimers as imaging agents are reported in (Table 1).

Dendrimers are real molecular platforms that may also be grafted to drugs. These systems allow targeting cells specifically and providing local delivery of drugs in patients [86].

### Proteins

For small animal imaging, with the development of a high number of fluorescent proteins (green, cyan, yellow fluorescent proteins and photoswitchable proteins) [87], several cell types can be now genetically labeled and visualized into the tumors [6, 88]. Cancer dynamics in living animal can be visualized, including tumor growth, metastasis, cell mobility, invasion and angiogenesis [89, 90]. Bright red-shifted proteins enable deeper imaging without limits of shorter wavelength proteins [88]. Cells that express a fusion of fluorescent protein with a receptor, an adhesion molecule or a binding protein, can be imaged by intravital microscopy and provide a study at the single cell level of intracellular signaling in tumor [6]. Photoswitchable fluorescent proteins are genetically encoded probes which allow instant labeling of proteins, organelles or cells with light of a specific wavelength [9]. With intravital imaging, after photoswitching of different regions of a tumor expressing a photoswitchable protein, it was possible to follow, on long periods, the behavior of cells coming from these regions according to the tumor environment [9].

## 3.2. Tumor Targets

### Tumor Markers

Tumor markers are proteins or glycoconjugates which are mainly expressed or over-expressed by tumor cells. Biological probes that specifically interact with tumor markers have been developed for *in vivo* imaging. They target the prostate specific membrane antigen (PSMA) [79, 91, 92], the carcinoembryo antigen (CEA) [73, 93, 94], the VEGF receptor

(Vascular Endothelial Growth Factor) [95-97] or the Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER-2) [75, 80, 95, 98-105]. The PSMA is a membrane and cytoplasmic glutamate carboxypeptidase which is involved in the cell cycle and in carcinogenesis associated with prostate cancer [106]. The CEA is involved in cell adhesion and is found in various cancers such as colorectal, gastric, pancreatic, lung and breast cancers [107]. The VEGF receptor involved in angiogenesis is over-expressed in most tumors but is also present in endothelial cells [108]. HER-2 is a tyrosine kinase membrane receptor involved in signal transduction pathways inducing growth and cellular differentiation. It is over-expressed in breast and ovarian cancers and other carcinomas [109].

There are other proteins over-expressed on the surface of several types of tumor cells such as MMP-2 [67, 68], integrins  $\alpha V\beta 3$  [76, 110], lectins [111] and mucins [94, 112, 113]. These molecules are less specific for tumor cells than the antigens described above because they are also expressed by healthy cells but in much smaller quantities. Their natural ligands are used as probes.

### **Metabolites**

Another approach to target tumor cells is to use their metabolic properties that differ from normal cells. Indeed, they absorb more nutrients because they over-express proteins involved in cell growth. Thus, administration of metabolites is used to target receptors over-expressed in tumor cells (Table 1). For example, galactosyl serum albumin that interacts with the  $\beta$ -D-galactose receptor [111] or folic acid (vitamin B9) that interacts with the folate receptor or folate-binding protein (FBP) [114-116] are both effective for locating various cancer (ovary, kidney, uterus, brain, colon, lung adenocarcinoma). Another example is the use of fluorescently labeled 2-Deoxyglucose as contrast agent because cancer cells exhibit highly elevated glucose metabolism compared to non-tumor cells [117, 118]. This approach is less specific for tumor cells than approaches targeting tumor antigenic markers but it is widely used in imaging modalities such as Magnetic Resonance Imaging (MRI) and Positron Emission Tomography (PET) for the specific detection of tumor cells and also for drug-targeted delivery to tumors.

## **3.3. Biological Probes**

### **Antibodies**

Monoclonal antibodies are widely used in fluorescence imaging because of their strong affinity for their target. However, their principal limitation is that they trigger immune response. In consequence, antibodies have been modified to reduce their immunogenicity and to allow administration in patients (humanized and recombinant antibodies) but these modifications often lead in affinity decrease for their target [119, 120].

Some of these antibodies have been investigated for *in vivo* fluorescence imaging applications. The anti-PSMA antibody that targets prostate tumor cells has been used to prove the utility of semiconductor quantum dots for NIR imaging [74, 79]. A humanized version of the J591 anti-PSMA antibody, coupled to indocyanine green, has shown remarkable ability to target PSMA positive cancer cells with

detectable signal still remaining 10 days after antibody intravenous injection [92].

The Alexa Fluor 488-conjugated anti-CEA antibody enhances visualization of colorectal and pancreatic cancer [93]. In this study, comparison of two different fluorophores reveals differences in dose-response and photobleaching *in vivo*, thus the choice of fluorophore significantly affects the signal intensity in the labeled tumor. The Fab fragment of the arcitumomab anti-CEA antibody coupled to NIR fluorescent cyanine dye DY-676 also exhibits specific targeting of colorectal xenograft with a maximal fluorescence signal about 8h after antibody intravenous injection [73]. A recent study used human serum albumin-CANIR nanoparticles coupled anti-CEA and anti-TAG27 (human mucin (MUC1)-like glycoprotein complex) antibodies for colon xenograft imaging. Results show specific targeting of both CEA and TAG27 over-expressing cells but only on lumen-facing tumors [94].

The anti-VEGF receptor antibody targets tumor cells and those associated with the angiogenic process. The NIR800-antiVEGFR2 antibody shows specificity for the target receptor in cultured endothelial cells and *in vivo*. This agent exhibits significant accumulation within 4T1 breast xenograft tumors [96]. Terwisscha van Scheltinga *et al.* made a complete study comparing PET and NIR imaging with anti-VEGF and anti-HER2 antibodies [95]. They used IRD 800CW-antibodies on ovarian, breast and gastric tumors. Their real-time intraoperative imaging allowed the highly specific and sensitive detection of tumor lesions at even the submillimeter level in intraperitoneal dissemination tumor models. *Ex vivo* fluorescence microscopy showed 800CW-antiVEGFR antibody in the extracellular matrix of the tumor, whereas the 800CW-antiHER2 antibody fluorescence was detected mainly on the tumor cell surface [95]. Others studies, listed in (Table 1), showed anti-HER-2 targeting tumor cells in breast, ovary, and other carcinomas [75, 80, 92] and anti-sp17 in hepatocellular carcinoma [121].

### **Peptides**

Peptides (or proteins) can also be used to target tumor cells but they are still at an experimental level. This approach consists in using the binding properties of the peptide (or protein) with glycoconjugates or membrane proteins over-expressed in tumor cells (Table 1).

For example, Chlorotoxin is used to detect various tumors (glioma, medulloblastoma, prostate cancer, bowel cancer and sarcomas) [68]. This peptide, derived from scorpion venom, is composed of 36 amino acids with 4 disulfide bonds. Cyanine 5.5 was coupled to primary amines of Chlorotoxin (3 amino functions). It interacts with MMP-2 and can be used to target tumor cells. A similar and interesting approach is to use the increased protease activity of cancer cells to target them without specific binding to MMP-2. Activable Cell-Penetrating Peptides coupled to Dendrimeric nanoparticles (ACPPDs) were used to visualize tumors in mice. Upon exposure to proteases characteristic of tumor tissue, the linker is cleaved, dissociating the inhibitory peptide and allowing the CPP to bind to and enter tumor cells [122, 123].

Others approaches are based on RGD peptide, which is a cyclo-peptide that mimics angiotensin. It is used to detect

tumor cells because it specifically interacts with  $\alpha_v\beta_3$  integrins over-expressed on the surface of many different tumor cells [76, 110]. Kimura *et al.* have selected extended RGD peptides by yeast surface display strategy [124]. This process drives to the selection of “knottin peptides”, a new class of agents for imaging. Their knottin peptides recognize  $\alpha V\beta 3$   $\alpha V\beta 5$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrins and have potential as diagnostic imaging agents as showed on athymic nude mice bearing subcutaneous U87MG glioblastoma tumors [124].

Another *in vivo* study used peptidic aptamers which were selected by phage display strategies. The CSNIDARAC peptidic aptamer strongly bound to H460 cells (large cell lung cancer) and was efficiently internalized into the cells. Using fluorescence dye-labeled liposomes in *in vivo* imaging, He *et al.* demonstrated selective homing of the CSNIDARAC-liposomes to tumor [125]. For further information on peptidic aptamers targeting tumor cells, the TumorHoPe database references the Tumor Homing Peptides known [126].

### Affibodies

Affibody molecules are small proteins based on a three alpha helix robust scaffold. Mutations on 13 amino acids positions confer to affibodies their recognition diversity. The affibody that recognizes a specific target is selected from the affibodies library by phage display strategy [127, 128]. The anti-EGFR affibody (or HER2/neu affibody) is the most investigated. The Cy5.5- and the Dylight750-HER2 affibody have provided high-sensitivity *in vivo* molecular imaging of EGFR-positive A431, BT-474 and NCI-N87 tumor cells compared to EGFR-negative MCF-7 and NDA-MB-468 tumor cells in mice [99-105]

### Nucleic Acids Aptamers

Nucleic acid aptamers are highly structured RNA or single-stranded DNA selected from degenerated library by Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) to bind with high affinity and specificity to a wide range of target molecules, from small molecules to polypeptides and proteins (for review [129, 130]). Recently Cell-SELEX has been developed [131] to select aptamers that specifically bind membrane tumor markers such as PMSA and MUC1 [91, 132].

Aptamers are considered as nucleic analog of antibodies with dissociation constant ranging from nanomolar to picomolar. They present more advantages than antibodies: their selection is fast and inexpensive, they have a smaller size (10-15 kDa) they exhibit higher tissue penetration and faster blood clearance that are suitable for imaging, they may be synthesized easily at low cost once isolated, they have low or no immunogenicity and toxicity and finally they support a lot of chemical modifications [133]. This last point allows the addition of functional groups that enable their detection, render them more biostable and modify their pharmacokinetic. The first aptamer used in imaging was designed against human neutrophil elastase [134]. This work demonstrated for the first time the potential feasibility of using an aptamer labeled with technetium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) as reagents for diagnostic imaging in mouse.

Only few examples of aptamers used in cancerology fluorescence imaging in living animals appears these last

years in the literature [135]. They used fluorophore directly linked to aptamer like cyanine and Alexa Fluor or aptamers coupled to different quantum dot.

The Tan's group used a Cell-SELEX to isolated an aptamer (TD05) that recognizes B-cell lymphoma (Ramos cell) without knowing which biomarker is the target [136]. Cy5-labeled aptamer was injected intravenously in mouse bearing Ramos cells and noninvasive (whole-body) fluorescence on living mouse was performed. They demonstrate that Cy5-TD05 could effectively recognize tumor cells with high sensitivity and specificity for molecular imaging.

Salva *et al.* described an aptamer against MUC1 that was conjugated to quantum Dot linked to doxorubicin (QD-MUC1-DOX) [113]. It was injected intraperitoneally in mice bearing human ovarian cancer cells xenograft and *in vivo* fluorescence imaging showed an accumulation of the conjugated specifically into the tumor [113]. QD-MUC1-DOX has potential theranostic properties: therapeutic and diagnostic by imaging [1].

Shi *et al.* used an activable aptamer probe for imaging [137]. This probe consists of an aptamer with a fluorophore and a quencher covalently attached at either terminus. Once the probe encounters the cell membrane protein tyrosine kinase-7 (PTK7) target on T-cell (lymphoblastic leukemia), conformational structure changes and activates fluorescence signal.

Recently a novel (sophisticated) cancer targeting therapeutic probe was developed on a single system using a multifunctional nanoparticle comprised of a nucleolin protein specific cancer targeting aptamer [138]. This nucleolin aptamer (AS1411) was coupled both to magnetic-fluorescent beads (MF) and 3'Cy5 labeled microRNA (miR221). Conjugated nanoparticles were transfected in C6 glioma cells then subcutaneously injected into nude mice before imaging the whole-body. They demonstrated proof-of-principle for this strategy and hope that this probe will be used to simultaneously diagnose by imaging and cure cancer by interfering with miRNA pathway.

Many others studies have described aptamers functionalized nanoparticles that is effective for imaging in culture cells but not yet in living subjects [139, 140] It's not doubt that in near future aptamers will represent new tools that will be frequently used in cancer imaging.

## 4. RECENT ADVANCES AND APPLICATIONS FOR *IN VIVO* IMAGING IN CANCER RESEARCH.

Whole-body imaging technologies are largely used in pre-clinical studies of cancer progression, response to therapy or targeted-probes development. The technology of whole-body imaging is available on the market (Berthold, www.bertholdtech.com; Hamamatsu, www.hama-comp.com; Caliper, Cambridge Research Instrumentation and VisEn Medical, PerkinElmer companies, www.perkinelmer.com; Fuji, www.fuji-sciences.com; Carestream, www.carestream-health.com; Biospace, www.biospacelab.co; Li-COR Biosciences, www.licor.com). Technical features of these commercial systems were previously described in a review of instruments [2] as well as applications: epi-illumination, spectral un-mixing, lifetime imaging or tomography for

brain, lung, gastrointestinal, and ovarian tumors detection. Several studies, using fluorescence microscopy, demonstrated that antibody-based tumor detection (VEGF [95], HER2 [95] and CD105 [141]), combined with a NIRF dye (IRDye 800CW) could be used to detect tumor lesions and angiogenesis with a high sensitivity and specificity.

Other imaging systems have been developed for applications of guided-surgery or endoscopy. With the user-friendly intra-operative imager (Fluobeam®), by an IV injected probe sensitive to angiogenesis (AngioStamp®, Angiosense), real-time imaging of tumors can be obtained that will drastically improve cancer surgery. New (“smart”) fluorescent probes associated with fluorescence endoscopy should help surgeons with tumor resection in the near future (Fluoptics, www.fluoptics.com; Visen, www.perkinelmer.com). A pre-clinical study just showed a better survival over a 6-month period when tumors were resected by using a Cy5-labeled cell-penetrating peptide conjugated to a dendrimer to guide surgery [122]. In humans, fluorescence-guided surgery and endoscopy could enhance surgical vision and help to the delineation and resection of tumor by the surgeon [142]. The lack of approved fluorescent agents in humans limited their clinical translation for this kind of application. However, indocyanine green (ICG), an approved NIR dye, has been largely used for surgery guidance in humans, from lymphatic mapping to liver cancer enhancement [143-146]. Several devices have been developed for real time observation of ICG fluorescence distribution displayed over a color video of the targeted tissue [147, 148]. Thus, the FLARE (Fluorescence-Assisted Resection and exploration) surgical imaging system has been successfully translated to clinic for image-guided oncologic surgery [148]. Endoscopic visualization of superficial gastric tumor was also possible by passive accumulation of ICG [149, 150]. Technology of CLE is also available on the market (Pentax Corporation; Mauna kea Technologies). Several prospective studies on patients demonstrated that CLE was able to distinguish gastric cancer or cholangiocarcinoma with high sensitivity and specificity [32].

Commercialized two photons microscopy (TPM) devices exist for skin imaging in the clinic (JenLab’s DermalInspect and MPTFlex, www.jenlab.de). TPM has been used to analyze normal and diseased human skin, both *ex vivo* and *in vivo*. On human skin biopsies, several groups demonstrated that two photon microscopy could discriminate normal *versus* cancerous skin tissues. Similar results were observed *in vivo* with multiphoton laser tomography and multiphoton FLIM [40]. The combination of endoscopy with TPM may allow the investigation of all possible organs *in vivo* without being limited by scattering. A flexible fiber based TPM clinical endoscope does not exist yet but systems have been developed using gradient refractive index optics [151, 152].

In animal studies, more accurate data are obtained by IVM but over a more limited period of time due to the associated surgery (Macrofluor, www.leica-microsystems.com, MacroScope, www.nikoninstruments.eu). IVM studies on cancer focus on development of angiogenesis, tumor microcirculation and phenomena taking place within it, such as cell adhesion phenomena in the vessels or adhesion of metastatic cells in the vessels secondarily invaded tissues [153]. IVM has already provided unprecedented molecular, cellular,

anatomical and functional insights into tumor pathophysiology [8]. From the first study on tumor vasculature in 1965 in a hamster cheek pouch [154] to nowadays, these imaging windows have made it possible to visualize a number of metastatic processes over several days, including the formation of new blood vessels [155-157], tumor cell colonization at a distant site [10] and tumor-stroma interactions [158]. The next generation of imaging rooms should be designed to visualize the spleen, liver and lymph nodes.

New advances in high resolution IVM, combined with imaging chambers and applied to visualization of metastasis behavior at subcellular resolution over several days, have been overviewed recently [6]. For tumor cells biology observation, high resolution acquisition and deep penetration in tissues is needed. Therefore, these requirements made multiphoton IVM the technique of choice for cancer researchers [152]. Thanks to the use of cranial imaging window, multiphoton laser scanning microscopy allowed to image the single steps of metastasis formation in real time [10]. Thus it was possible to follow the fate of each cancer cell metastasis with regard to deep blood vessels in the brain of the mouse over minutes to months. Furthermore, the creation, with multiphoton excitation, of a SHG signal by collagen type I fibers and elastin can reveal the structure of extracellular matrix and thus better characterize tumor microenvironment. Taking advantage of labeling by fluorescent proteins or dyes, it is possible to visualize simultaneously several cell types in tumor over time. Thus, tumor cells, macrophages, fibroblasts or regulatory T cells could be observed through transgenic fluorescent protein reporters or specific labeled antibodies, and blood vessels visualized by intravenous injection of fluorescent dextrans [7]. By using FRET IVM, dynamic changes in subcellular signaling events that are required for metastasis can be imaged over time, whereas multicolor IVM allows the visualization of cell-cell and cell-molecule interactions. By combining imaging chambers and photomarking of regions of interest with photoconvertible fluorophores [9, 159, 160], single tumor cells can be tracked and visualized over several days. OFDI has been used to study angiogenesis, lymphangiogenesis and tissue viability [11]. These advances in IVM allow highlighting distinct cellular behaviors in different areas of the tumor and tumor microenvironments [7].

In addition to these mechanistic insights, IVM may also provide new opportunities to improve cancer detection and therapy. The use of IVM in preclinical models for studies of tumor pathophysiology has been reviewed previously [157]. For example, IVM, has been used to study mechanisms involved in temporal and spatial changes of blood vessels (morphology and functionality) after electroporation [161].

## CONCLUSION

In small animals, optical imaging is a low-cost technology by which tumor cells are detected over several weeks. Whole-body imaging gives access to relative quantitative detection with a “crude” topological definition over a long period. The technology is rather simple and is now available on the market. Cancer progression, response to therapy or development of probes is realized with these systems. With relevant probes (NIR dyes and tumor markers) the detection can be performed with a very high sensitivity and specificity. Applications for optical imaging are important and clinical

translation is possible. Significant progresses have been performed with systems but also with fluorescent agents. Fluorescence-guided surgery and endoscopy should improve detection and allow a more precise resection of tumors by surgeon. Furthermore, endoscopy gives access to tumors that were not accessible by non-invasive fluorescence microscopy.

IVM is an important tool for the understanding of tumor cells dynamic and develop new strategies for cancer treatments. Novel cancer models are developed, in mice. It results in mice that have a spectrum of tumors which strongly resembles human tumor development and progression. Incorporate fluorophores in these tumors is challenging but should advance the translational aspects of future IVM studies.

With multiphoton microscopy, IVM, by following spatio-temporal regulation of cell-cell, cell-matrix, and molecular interactions in tumor microenvironment, will continue to play a role in the comprehension of cancer pathophysiology and in immune-cancer interactions.

Therefore, following and quantifying tumor progression *in vivo* by optical imaging is a fantastic tool to assess the effectiveness of cancer therapies (surgery, radiotherapy, gene therapy). Added to the routinely used imaging techniques, it can be used for diagnostic evaluation and surgical management.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Support from the ITAV (Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant) program, from the Region Midi Pyrénées, from the ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer) (n°8505), from la Ligue contre le cancer, from FP7 Oncomir (HEALTH-F2 2007-201102) and LEA-EBAM (European Associated Laboratory on Electroporation in Biology And Medicine of the CNRS) should be acknowledged.

#### PATIENT'S CONSENT

Declared none.

#### REFERENCES

- [1] James ML, Gambhir SS. A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. *Physiol Rev* 2012; 92(2): 897-965.
- [2] Leblond F, Davis SC, Valdes PA, Pogue BW. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. *J Photochem Photobiol B* 2010; 98(1): 77-94.
- [3] Paganin-Gioanni A, Bellard E, Golzio M, Teissie J. Imagerie de fluorescence du petit animal : visualisation d'événements moléculaires et cellulaires dans l'animal vivant. *STAL* 2009; 36: 41-7.
- [4] Cemazar M, Golzio M, Escoffre JM, Couderc B, Sersa G, Teissie J. *In vivo* imaging of tumor growth after electrochemotherapy with cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348(3): 997-1002.
- [5] Escoffre JM, Debin A, Reynes JP, *et al.* Long-lasting *in vivo* gene silencing by electrotransfer of shRNA expressing plasmid. *Technol Cancer Res Treat* 2008; 7(2): 109-16.
- [6] Beerling E, Ritsma L, Vrisekoop N, Derksen PW, van Rheenen J. Intravital microscopy: new insights into metastasis of tumors. *J Cell Sci* 2011; 124(Pt 3): 299-310.
- [7] Egeblad M, Ewald AJ, Askautrud HA, *et al.* Visualizing stromal cell dynamics in different tumor microenvironments by spinning disk confocal microscopy. *Dis Model Mech* 2008; 1(2-3): 155-67.
- [8] Jain RK, Munn LL, Fukumura D. Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(4): 266-76.
- [9] Kedrin D, Gligorijevic B, Wyckoff J, *et al.* Intravital imaging of metastatic behavior through a mammary imaging window. *Nat Methods* 2008; 5(12): 1019-21.
- [10] Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, *et al.* Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* 2010; 16(1): 116-22.
- [11] Vakoc BJ, Lanning RM, Tyrrell JA, *et al.* Three-dimensional microscopy of the tumor microenvironment *in vivo* using optical frequency domain imaging. *Nat Med* 2009; 15(10): 1219-23.
- [12] Sodee DB, Conant R, Chalfant M, *et al.* Preliminary imaging results using In-111 labeled CYT-356 (Prostascint) in the detection of recurrent prostate cancer. *Clin Nucl Med* 1996; 21(10): 759-67.
- [13] Nanus DM, Milowsky MI, Kostakoglu L, *et al.* Clinical use of monoclonal antibody HuJ591 therapy: targeting prostate specific membrane antigen. *J Urol* 2003; 170(6 Pt 2): S84-8.
- [14] Abdel-Nabi H, Doerr RJ, Chan HW, Balu D, Schmelter RF, Maguire RT. In-111-labeled monoclonal antibody immunoscintigraphy in colorectal carcinoma: safety, sensitivity, and preliminary clinical results. *Radiology* 1990; 175(1): 163-71.
- [15] Moffat FL, Jr., Pinsky CM, Hammershaimb L, *et al.* Clinical utility of external immunoscintigraphy with the IMMU-4 technetium-99m Fab' antibody fragment in patients undergoing surgery for carcinoma of the colon and rectum: results of a pivotal, phase III trial. The Immunomedics Study Group. *J Clin Oncol* 1996; 14(8): 2295-305.
- [16] Breitz HB, Tyler A, Bjorn MJ, Lesley T, Weiden PL. Clinical experience with Tc-99m nofetumomab merpentan (Verluma) radioimmunoscintigraphy. *Clin Nucl Med* 1997; 22(9): 615-20.
- [17] Paganin-Gioanni A, Bellard E, Paquereau L, Ecochard V, Golzio M, Teissie J. Fluorescence imaging agents in cancerology. *Radiol Oncol* 2010; 44(3): 142-8.
- [18] Lichtman JW, Conchello JA. Fluorescence microscopy. *Nat Methods* 2005; 2(12): 910-9.
- [19] Weissleder R. A clearer vision for *in vivo* imaging. *Nat Biotechnol* 2001; 19(4): 316-7.
- [20] Wagnieres GA, Star WM, Wilson BC. *In vivo* fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochem Photobiol* 1998; 68(5): 603-32.
- [21] Rajwa B, Bernas T, Acker H, Dobrucki J, Robinson JP. Single- and two-photon spectral imaging of intrinsic fluorescence of transformed human hepatocytes. *Microsc Res Tech* 2007; 70(10): 869-79.
- [22] Inoue Y, Izawa K, Kiryu S, Tojo A, Ohtomo K. Diet and abdominal autofluorescence detected by *in vivo* fluorescence imaging of living mice. *Mol Imaging* 2008; 7(1): 21-7.
- [23] Troy T, Jekic-McMullen D, Sambucetti L, Rice B. Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models. *Mol Imaging* 2004; 3(1): 9-23.
- [24] Walter T, Shattuck DW, Baldock R, *et al.* Visualization of image data from cells to organisms. *Nat Methods* 2010; 7(3 Suppl): S26-41.
- [25] Hillman EM, Amoozegar CB, Wang T, *et al.* *In vivo* optical imaging and dynamic contrast methods for biomedical research. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 2011; 369(1955): 4620-43.
- [26] Bouchard MB, MacLaurin SA, Dwyer PJ, Mansfield J, Levenson R, Krucker T. Technical considerations in longitudinal multispectral small animal molecular imaging. *J Biomed Opt* 2007; 12(5): 051601.
- [27] Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 1993; 143(4): 1055-62.

- [28] Shan S, Sorg B, Dewhirst MW. A novel rodent mammary window of orthotopic breast cancer for intravital microscopy. *Microvasc Res* 2003; 65(2): 109-17.
- [29] Yuan F, Salehi HA, Boucher Y, Vasthare US, Tuma RF, Jain RK. Vascular permeability and microcirculation of gliomas and mammary carcinomas transplanted in rat and mouse cranial windows. *Cancer Res* 1994; 54(17): 4564-8.
- [30] MacDonald IC, Chambers AF. Chapter 9. Intravital videomicroscopy in angiogenesis research. *Methods Enzymol* 2008; 444: 201-30.
- [31] Makale M. Intravital imaging and cell invasion. *Methods Enzymol* 2007; 426: 375-401.
- [32] Paull PE, Hyatt BJ, Wassef W, Fischer AH. Confocal laser endomicroscopy: a primer for pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135(10): 1343-8.
- [33] Ito S, Muguruma N, Kimura T, et al. Principle and clinical usefulness of the infrared fluorescence endoscopy. *J Med Invest* 2006; 53(1-2): 1-8.
- [34] Kantsevov SV, Adler DG, Conway JD, et al. Confocal laser endomicroscopy. *Gastrointest Endosc* 2009; 70(2): 197-200.
- [35] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2005; 2(12): 932-40.
- [36] Oheim M, Michael DJ, Geisbauer M, Madsen D, Chow RH. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58(7): 788-808.
- [37] Hilderbrand SA, Weissleder R. Near-infrared fluorescence: application to *in vivo* molecular imaging. *Curr Opin Chem Biol* 2010; 14(1): 71-9.
- [38] Campagnola PJ, Loew LM. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nat Biotechnol* 2003; 21(11): 1356-60.
- [39] Mohler W, Millard AC, Campagnola PJ. Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods* 2003; 29(1): 97-109.
- [40] Perry SW, Burke RM, Brown EB. Two-photon and second harmonic microscopy in clinical and translational cancer research. *Ann Biomed Eng* 2012; 40(2): 277-91.
- [41] Provenzano PP, Eliceiri KW, Keely PJ. Multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to monitor metastasis and the tumor microenvironment. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26(4): 357-70.
- [42] Bullen A. Microscopic imaging techniques for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(1): 54-67.
- [43] Cavanagh LL, Weninger W. Dendritic cell behaviour *in vivo*: lessons learned from intravital two-photon microscopy. *Immunol Cell Biol* 2008; 86(5): 428-38.
- [44] Sacconi L, O'Connor RP, Jasaitis A, Masi A, Buffelli M, Pavone FS. *In vivo* multiphoton nanosurgery on cortical neurons. *J Biomed Opt* 2007; 12(5): 050502.
- [45] Sorg H, Krueger C, Vollmar B. Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. *J Anat* 2007; 211(6): 810-8.
- [46] Leister I, Schuler P, Vollmar B, et al. A peritoneal cavity chamber for intravital microscopy of the liver under conditions of pneumoperitoneum. *Surg Endosc* 2003; 17(6): 939-42.
- [47] Sandoval RM, Kennedy MD, Low PS, Molitoris BA. Uptake and trafficking of fluorescent conjugates of folic acid in intact kidney determined using intravital two-photon microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287(2): C517-26.
- [48] Condeelis J, Segall JE. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(12): 921-30.
- [49] Brown EB, Campbell RB, Tsuzuki Y, et al. *In vivo* measurement of gene expression, angiogenesis and physiological function in tumors using multiphoton laser scanning microscopy. *Nat Med* 2001; 7(7): 864-8.
- [50] Ntziachristos V, Schellenberger EA, Ripoll J, et al. Visualization of antitumor treatment by means of fluorescence molecular tomography with an annexin V-Cy5.5 conjugate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(33): 12294-9.
- [51] Koenig A, Boutet J, Herve L, et al. Fluorescence diffuse optical tomographic (fDOT) system for small animal studies. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2007; 2007: 2626-9.
- [52] Schulz RB, Ripoll J, Ntziachristos V. Noncontact optical tomography of turbid media. *Opt Lett* 2003; 28(18): 1701-3.
- [53] Hyde D, de Kleine R, MacLaurin SA, et al. Hybrid FMT-CT imaging of amyloid-beta plaques in a murine Alzheimer's disease model. *Neuroimage* 2009; 44(4): 1304-11.
- [54] Ballou B, Ernst LA, Waggoner AS. Fluorescence imaging of tumors *in vivo*. *Curr Med Chem* 2005; 12(7): 795-805.
- [55] Rao J, Dragulescu-Andrasi A, Yao H. Fluorescence imaging *in vivo*: recent advances. *Curr Opin Biotechnol* 2007; 18(1): 17-25.
- [56] Kovar JL, Simpson MA, Schutz-Geschwender A, Olive DM. A systematic approach to the development of fluorescent contrast agents for optical imaging of mouse cancer models. *Anal Biochem* 2007; 367(1): 1-12.
- [57] Jin ZH, Jossierand V, Razkin J, et al. Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c-(RGDFK)-4. *Mol Imaging* 2006; 5(3): 188-97.
- [58] Thomas TP, Patri AK, Myc A, et al. *In vitro* targeting of synthesized antibody-conjugated dendrimer nanoparticles. *Biomacromolecules* 2004; 5(6): 2269-74.
- [59] Ballou B. Quantum dot surfaces for use *in vivo* and *in vitro*. *Curr Top Dev Biol* 2005; 70: 103-20.
- [60] Zhang T, Stilwell JL, Gerion D, et al. Cellular effect of high doses of silica-coated quantum dot profiled with high throughput gene expression analysis and high content cellomics measurements. *Nano Lett* 2006; 6(4): 800-8.
- [61] Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect* 2006; 114(2): 165-72.
- [62] Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat Biotechnol* 2004; 22(1): 47-52.
- [63] Rikans LE, Yamano T. Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 14(2): 110-7.
- [64] Kirchner C, Liedl T, Kudera S, et al. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Lett* 2005; 5(2): 331-8.
- [65] Stroh M, Zimmer JP, Duda DG, et al. Quantum dots spectrally distinguish multiple species within the tumor milieu *in vivo*. *Nat Med* 2005; 11(6): 678-82.
- [66] Razkin J, Jossierand V, Boturny D, et al. Activatable fluorescent probes for tumour-targeting imaging in live mice. *ChemMedChem* 2006; 1(10): 1069-72.
- [67] Bremer C, Bredow S, Mahmood U, Weissleder R, Tung CH. Optical imaging of matrix metalloproteinase-2 activity in tumors: feasibility study in a mouse model. *Radiology* 2001; 221(2): 523-9.
- [68] Veiseh M, Gabikian P, Bahrami SB, et al. Tumor paint: a chlorotoxin: Cy5.5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci. *Cancer Res* 2007; 67(14): 6882-8.
- [69] Reshetnyak YK, Andreev OA, Lehnert U, Engelman DM. Translocation of molecules into cells by pH-dependent insertion of a transmembrane helix. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(17): 6460-5.
- [70] Andreev OA, Dupuy AD, Segala M, et al. Mechanism and uses of a membrane peptide that targets tumors and other acidic tissues *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(19): 7893-8.
- [71] Jin ZH, Razkin J, Jossierand V, et al. *In vivo* noninvasive optical imaging of receptor-mediated RGD internalization using self-quenched Cy5-labeled RAFT-c-(RGDFK)-4. *Mol Imaging* 2007; 6(1): 43-55.
- [72] Ntziachristos V, Bremer C, Weissleder R. Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable *in vivo* molecular imaging. *Eur Radiol* 2003; 13(1): 195-208.
- [73] Lisy MR, Goermer A, Thomas C, et al. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in mice. *Radiology* 2008; 247(3): 779-87.
- [74] Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LW, Nie S. *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 2004; 22(8): 969-76.
- [75] Takeda M, Tada H, Higuchi H, et al. *In vivo* single molecular imaging and sentinel node navigation by nanotechnology for

- molecular targeting drug-delivery systems and tailor-made medicine. *Breast Cancer* 2008; 15(2): 145-52.
- [76] Cai W, Chen X. Preparation of peptide-conjugated quantum dots for tumor vasculature-targeted imaging. *Nat Protoc* 2008; 3(1): 89-96.
- [77] Swanson SD, Kukowska-Latallo JF, Patri AK, *et al*. Targeted gadolinium-loaded dendrimer nanoparticles for tumor-specific magnetic resonance contrast enhancement. *Int J Nanomedicine* 2008; 3(2): 201-10.
- [78] Zhu W, Okollie B, Bhujwalla ZM, Artemov D. PAMAM dendrimer-based contrast agents for MR imaging of Her-2/neu receptors by a three-step pretargeting approach. *Magn Reson Med* 2008; 59(4): 679-85.
- [79] Patri AK, Myc A, Beals J, Thomas TP, Bander NH, Baker JR, Jr. Synthesis and *in vitro* testing of J591 antibody-dendrimer conjugates for targeted prostate cancer therapy. *Bioconjug Chem* 2004; 15(6): 1174-81.
- [80] Shukla R, Thomas TP, Peters JL, *et al*. HER2 specific tumor targeting with dendrimer conjugated anti-HER2 mAb. *Bioconjug Chem* 2006; 17(5): 1109-15.
- [81] Thomas TP, Majoros IJ, Kotlyar A, *et al*. Targeting and inhibition of cell growth by an engineered dendritic nanodevice. *J Med Chem* 2005; 48(11): 3729-35.
- [82] Malik N, Wiwattanapatapee R, Klopsch R, *et al*. Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility *in vitro*, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers *in vivo*. *J Control Release* 2000; 65(1-2): 133-48.
- [83] Xu R, Wang Y, Wang X, Jeong EK, Parker DL, Lu ZR. *In vivo* evaluation of a PAMAM-cystamine-(Gd-DO3A) conjugate as a biodegradable macromolecular MRI contrast agent. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232(8): 1081-9.
- [84] Boswell CA, Eck PK, Regino CA, *et al*. Synthesis, characterization, and biological evaluation of integrin alphavbeta3-targeted PAMAM dendrimers. *Mol Pharm* 2008; 5(4): 527-39.
- [85] Hill E, Shukla R, Park SS, Baker JR, Jr. Synthetic PAMAM-RGD conjugates target and bind to odontoblast-like MDPC 23 cells and the predentin in tooth organ cultures. *Bioconjug Chem* 2007; 18(6): 1756-62.
- [86] Majoros IJ, Williams CR, Baker JR, Jr. Current dendrimer applications in cancer diagnosis and therapy. *Curr Top Med Chem* 2008; 8(14): 1165-79.
- [87] Giepmans BN, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 2006; 312(5771): 217-24.
- [88] Hoffman RM. Cellular and subcellular imaging in live mice using fluorescent proteins. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; 13(4): 537-44.
- [89] Hoffman RM. Imaging cancer dynamics *in vivo* at the tumor and cellular level with fluorescent proteins. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26(4): 345-55.
- [90] Yagublu V, Ahmadova Z, Hafner M, Keese M. Review: Fluorescent protein-based tumor models. *In vivo* 2012; 26(4): 599-607.
- [91] Lupold SE, Hicke BJ, Lin Y, Coffey DS. Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res* 2002; 62(14): 4029-33.
- [92] Nakajima T, Mitsunaga M, Bander NH, Heston WD, Choyke PL, Kobayashi H. Targeted, activatable, *in vivo* fluorescence imaging of prostate-specific membrane antigen (PSMA) positive tumors using the quenched humanized J591 antibody-indocyanine green (ICG) conjugate. *Bioconjug Chem* 2011; 22(8): 1700-5.
- [93] Kaushal S, McElroy MK, Luiken GA, *et al*. Fluorophore-conjugated anti-CEA antibody for the intraoperative imaging of pancreatic and colorectal cancer. *J Gastrointest Surg* 2008; 12(11): 1938-50.
- [94] Cohen S, Margel S. Engineering of near IR fluorescent albumin nanoparticles for *in vivo* detection of colon cancer. *J Nanobiotechnology* 2012; 10(1): 36.
- [95] Terwischa van Scheltinga AG, van Dam GM, Nagengast WB, *et al*. Intraoperative near-infrared fluorescence tumor imaging with vascular endothelial growth factor and human epidermal growth factor receptor 2 targeting antibodies. *J Nucl Med* 2011; 52(11): 1778-85.
- [96] Virostko J, Xie J, Hallahan DE, Arteaga CL, Gore JC, Manning HC. A molecular imaging paradigm to rapidly profile response to angiogenesis-directed therapy in small animals. *Mol Imaging Biol* 2009; 11(3): 204-12.
- [97] Wang H, Chen K, Niu G, Chen X. Site-specifically biotinylated VEGF(121) for near-infrared fluorescence imaging of tumor angiogenesis. *Mol Pharm* 2009; 6(1): 285-94.
- [98] Chen CH, Chernis GA, Hoang VQ, Landgraf R. Inhibition of heregulin signaling by an aptamer that preferentially binds to the oligomeric form of human epidermal growth factor receptor-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(16): 9226-31.
- [99] Qi S, Miao Z, Liu H, Xu Y, Feng Y, Cheng Z. Evaluation of four affibody-based near-infrared fluorescent probes for optical imaging of epidermal growth factor receptor positive tumors. *Bioconjug Chem* 2012. [Epub ahead of print].
- [100] Miao Z, Ren G, Liu H, Jiang L, Cheng Z. Cy5.5-labeled Affibody molecule for near-infrared fluorescent optical imaging of epidermal growth factor receptor positive tumors. *J Biomed Opt* 2010; 15(3): 036007.
- [101] van de Ven SM, Elias SG, Chan CT, *et al*. Optical imaging with her2-targeted affibody molecules can monitor hsp90 treatment response in a breast cancer xenograft mouse model. *Clin Cancer Res* 2012; 18(4): 1073-81.
- [102] Zielinski R, Hassan M, Lyakhov I, *et al*. Affibody-DyLight Conjugates for *In vivo* Assessment of HER2 Expression by Near-Infrared Optical Imaging. *PLoS One* 2012; 7(7): e41016.
- [103] Gong H, Kovar J, Little G, Chen H, Olive DM. *In vivo* imaging of xenograft tumors using an epidermal growth factor receptor-specific affibody molecule labeled with a near-infrared fluorophore. *Neoplasia* 2010; 12(2): 139-49.
- [104] Gao J, Chen K, Miao Z, *et al*. Affibody-based nanoprobe for HER2-expressing cell and tumor imaging. *Biomaterials* 2011; 32(8): 2141-8.
- [105] Ardashirpour Y, Chernomordik V, Zielinski R, *et al*. *In vivo* fluorescence lifetime imaging monitors binding of specific probes to cancer biomarkers. *PLoS One* 2012; 7(2): e31881.
- [106] Tasch J, Gong M, Sadelain M, Heston WD. A unique folate hydrolase, prostate-specific membrane antigen (PSMA): a target for immunotherapy? *Crit Rev Immunol* 2001; 21(1-3): 249-61.
- [107] Goldstein MJ, Mitchell EP. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest* 2005; 23(4): 338-51.
- [108] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935): 1306-9.
- [109] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, *et al*. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244(4905): 707-12.
- [110] Shukla R, Thomas TP, Peters J, Kotlyar A, Myc A, Baker Jr JR. Tumor angiogenic vasculature targeting with PAMAM dendrimer-RGD conjugates. *Chem Commun (Camb)* 2005; 14(46): 5739-41.
- [111] Gunn AJ, Hama Y, Koyama Y, Kohn EC, Choyke PL, Kobayashi H. Targeted optical fluorescence imaging of human ovarian adenocarcinoma using a galactosyl serum albumin-conjugated fluorophore. *Cancer Sci* 2007; 98(11): 1727-33.
- [112] Hicke BJ, Stephens AW, Gould T, *et al*. Tumor targeting by an aptamer. *J Nucl Med* 2006; 47(4): 668-78.
- [113] Savla R, Taratula O, Garbuzenko O, Minko T. Tumor targeted quantum dot-mucin 1 aptamer-doxorubicin conjugate for imaging and treatment of cancer. *J Control Release* 2011; 153(1): 16-22.
- [114] Kamaly N, Kalber T, Thanou M, Bell JD, Miller AD. Folate receptor targeted bimodal liposomes for tumor magnetic resonance imaging. *Bioconjug Chem* 2009; 20(4): 648-55.
- [115] Yang C, Ding N, Xu Y, *et al*. Folate receptor-targeted quantum dot liposomes as fluorescence probes. *J Drug Target* 2009; 17(7): 502-11.
- [116] van Dam GM, Themelis G, Crane LM, *et al*. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor-alpha targeting: first in-human results. *Nat Med* 2011; 17(10): 1315-9.

- [117] Zhou H, Luby-Phelps K, Mickey BE, Habib AA, Mason RP, Zhao D. Dynamic near-infrared optical imaging of 2-deoxyglucose uptake by intracranial glioma of athymic mice. *PLoS One* 2009; 4(11): e8051.
- [118] Kovar JL, Volcheck W, Sevick-Muraca E, Simpson MA, Olive DM. Characterization and performance of a near-infrared 2-deoxyglucose optical imaging agent for mouse cancer models. *Anal Biochem* 2009; 384(2): 254-62.
- [119] Lin MZ, Teitell MA, Schiller GJ. The evolution of antibodies into versatile tumor-targeting agents. *Clin Cancer Res* 2005; 11(1): 129-38.
- [120] Trail PA, King HD, Dubowchik GM. Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52(5): 328-37.
- [121] Li FQ, Zhang SX, An LX, Gu YQ. *In vivo* molecular targeting effects of anti-Sp17- ICG-Der-02 on hepatocellular carcinoma evaluated by an optical imaging system. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30: 25.
- [122] Nguyen QT, Olson ES, Aguilera TA, et al. Surgery with molecular fluorescence imaging using activatable cell-penetrating peptides decreases residual cancer and improves survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(9): 4317-22.
- [123] Olson ES, Jiang T, Aguilera TA, et al. Activatable cell penetrating peptides linked to nanoparticles as dual probes for *in vivo* fluorescence and MR imaging of proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(9): 4311-6.
- [124] Kimura RH, Cheng Z, Gambhir SS, Cochran JR. Engineered knottin peptides: a new class of agents for imaging integrin expression in living subjects. *Cancer Res* 2009; 69(6): 2435-42.
- [125] He X, Na MH, Kim JS, et al. A novel peptide probe for imaging and targeted delivery of liposomal doxorubicin to lung tumor. *Mol Pharm* 2011; 8(2): 430-8.
- [126] Kapoor P, Singh H, Gautam A, Chaudhary K, Kumar R, Raghava GP. TumorHoPe: a database of tumor homing peptides. *PLoS One* 2012; 7(4): e35187.
- [127] Orlova A, Feldwisch J, Abrahmsen L, Tolmachev V. Update: affibody molecules for molecular imaging and therapy for cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2007; 22(5): 573-84.
- [128] Tolmachev V, Orlova A, Nilsson FY, Feldwisch J, Wennborg A, Abrahmsen L. Affibody molecules: potential for *in vivo* imaging of molecular targets for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7(4): 555-68.
- [129] Mascini M, Palchetti I, Tombelli S. Nucleic acid and peptide aptamers: fundamentals and bioanalytical aspects. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012; 51(6): 1316-32.
- [130] Tan WH, Wang H, Chen Y, et al. Molecular aptamers for drug delivery. *Trends Biotechnol* 2011; 29(12): 634-40.
- [131] Fang XH, Tan WH. Aptamers Generated from Cell-SELEX for Molecular Medicine: A Chemical Biology Approach. *Accounts Chem Res* 2010; 43(1): 48-57.
- [132] Ferreira CS, Matthews CS, Missailidis S. DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers. *Tumour Biol* 2006; 27(6): 289-301.
- [133] Perkins AC, Missailidis S. Radiolabelled aptamers for tumour imaging and therapy. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2007; 51(4): 292-6.
- [134] Charlton J, Sennello J, Smith D. *In vivo* imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase. *Chem Biol* 1997; 4(11): 809-16.
- [135] Cibiel A, Pestourie C, Duconge F. *In vivo* uses of aptamers selected against cell surface biomarkers for therapy and molecular imaging. *Biochimie* 2012; 94(7): 1595-606.
- [136] Shi H, Tang Z, Kim Y, et al. *In vivo* fluorescence imaging of tumors using molecular aptamers generated by cell-SELEX. *Chem Asian J* 2010; 5(10): 2209-13.
- [137] Shi H, He X, Wang K, et al. Activatable aptamer probe for contrast-enhanced *in vivo* cancer imaging based on cell membrane protein-triggered conformation alteration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(10): 3900-5.
- [138] Kim JK, Choi KJ, Lee M, Jo M-h, Kim S. Molecular imaging of a cancer-targeting theragnostics probe using a nucleolin aptamer- and microRNA-221 molecular beacon-conjugated nanoparticle. *Biomaterials* 2012; 33(1): 207-17.
- [139] Xiao Z, Farokhzad OC. Aptamer-functionalized nanoparticles for medical applications: challenges and opportunities. *ACS Nano* 2012; 6(5): 3670-6.
- [140] Xing H, Wong NY, Xiang Y, Lu Y. DNA aptamer functionalized nanomaterials for intracellular analysis, cancer cell imaging and drug delivery. *Curr Opin Chem Biol* 2012.
- [141] Yang Y, Zhang Y, Hong H, Liu G, Leigh BR, Cai W. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging of CD105 expression during tumor angiogenesis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011; 38(11): 2066-76.
- [142] Taruttis A, Ntziachristos V. Translational optical imaging. *AJR Am J Roentgenol* 2012; 199(2): 263-71.
- [143] Crane LM, Themelis G, Arts HJ, et al. Intraoperative near-infrared fluorescence imaging for sentinel lymph node detection in vulvar cancer: first clinical results. *Gynecol Oncol* 2011; 120(2): 291-5.
- [144] Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, et al. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer* 2009; 115(11): 2491-504.
- [145] Kelder W, Nimura H, Takahashi N, Mitsumori N, van Dam GM, Yanaga K. Sentinel node mapping with indocyanine green (ICG) and infrared ray detection in early gastric cancer: an accurate method that enables a limited lymphadenectomy. *Eur J Surg Oncol* 2010; 36(6): 552-8.
- [146] Kitai T, Inomoto T, Miwa M, Shikayama T. Fluorescence navigation with indocyanine green for detecting sentinel lymph nodes in breast cancer. *Breast Cancer* 2005; 12(3): 211-5.
- [147] Tagaya N, Yamazaki R, Nakagawa A, et al. Intraoperative identification of sentinel lymph nodes by near-infrared fluorescence imaging in patients with breast cancer. *Am J Surg* 2008; 195(6): 850-3.
- [148] Troyan SL, Kianzad V, Gibbs-Strauss SL, et al. The FLARE intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(10): 2943-52.
- [149] Kimura T, Muguruma N, Ito S, et al. Infrared fluorescence endoscopy for the diagnosis of superficial gastric tumors. *Gastrointest Endosc* 2007; 66(1): 37-43.
- [150] Mataka N, Nagao S, Kawaguchi A, et al. Clinical usefulness of a new infrared videoendoscope system for diagnosis of early stage gastric cancer. *Gastrointest Endosc* 2003; 57(3): 336-42.
- [151] Konig K, Weinigel M, Hoppert D, et al. Multiphoton tissue imaging using high-NA microendoscopes and flexible scan heads for clinical studies and small animal research. *J Biophotonics* 2008; 1(6): 506-13.
- [152] Niesner RA, Hauser AE. Recent advances in dynamic intravital multi-photon microscopy. *Cytometry A* 2011; 79(10): 789-98.
- [153] Lavigne AC, Carrière V, Amalric F, Girard JP, M'Rini C. Apports de la microscopie réalisée in situ sur l'animal vivant dans l'étude du cancer. *Médecine/Sciences* 2002; 18: 217-25.
- [154] Goodall CM, Sanders AG, Shubik P. Studies of vascular patterns in living tumors with a transparent chamber inserted in hamster cheek pouch. *J Natl Cancer Inst* 1965; 35(3): 497-521.
- [155] Abdul-Karim MA, Al-Kofahi K, Brown EB, Jain RK, Roysam B. Automated tracing and change analysis of angiogenic vasculature from *in vivo* multiphoton confocal image time series. *Microvasc Res* 2003; 66(2): 113-25.
- [156] Farhadi MR, Capelle HH, Erber R, Ullrich A, Vajkoczy P. Combined inhibition of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor signaling: effects on the angiogenesis, microcirculation, and growth of orthotopic malignant gliomas. *J Neurosurg* 2005; 102(2): 363-70.
- [157] Fukumura D, Duda DG, Munn LL, Jain RK. Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in pre-clinical models. *Microcirculation* 2010; 17(3): 206-25.
- [158] Lohela M, Werb Z. Intravital imaging of stromal cell dynamics in tumors. *Curr Opin Genet Dev* 2010; 20(1): 72-8.
- [159] Ando R, Hama H, Yamamoto-Hino M, Mizuno H, Miyawaki A. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(20): 12651-6.

- [160] Gurskaya NG, Verkhusha VV, Shcheglov AS, *et al.* Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nat Biotechnol* 2006; 24(4): 461-5.
- [161] Markelc B, Bellard E, Sersa G, *et al.* *In vivo* Molecular Imaging and histological analysis of changes induced by electric pulses used for plasmid DNA electrotransfer to the skin: A study in a dorsal window chamber in mice. *J Membr Biol* 2012; 245(9): 545-54.
- [162] Tong R, Coyle VJ, Tang L, Barger AM, Fan TM, Cheng J. Poly lactide nanoparticles containing stably incorporated cyanine dyes for *in vitro* and *in vivo* imaging applications. *Microsc Res Tech* 2010; 73(9): 901-9.
- [163] Chen Y, Dhara S, Banerjee SR, *et al.* A low molecular weight PSMA-based fluorescent imaging agent for cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390(3): 624-9.
- [164] Rosenthal EL, Kulbersh BD, King T, Chaudhuri TR, Zinn KR. Use of fluorescent labeled anti-epidermal growth factor receptor antibody to image head and neck squamous cell carcinoma xenografts. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(4): 1230-8.
- [165] Kimura RH, Miao Z, Cheng Z, Gambhir SS, Cochran JR. A Dual-labeled knottin peptide for PET and near-infrared fluorescence imaging of integrin expression in living subjects. *Bioconjug Chem* 2010.
- [166] Themelis G, Harlaar NJ, Kelder W, *et al.* Enhancing surgical vision by using real-time imaging of alphavbeta3-integrin targeted near-infrared fluorescent agent. *Ann Surg Oncol* 2011; 18(12): 3506-13.
- [167] Hong H, Zhang Y, Severin GW, *et al.* Multimodality imaging of breast cancer experimental lung metastasis with bioluminescence and a monoclonal antibody dual-labeled with (89)Zr and IRDye 800CW. *Mol Pharm* 2012. [Epub ahead of print].
- [168] Mi J, Liu Y, Rabbani ZN, *et al.* *In vivo* selection of tumor-targeting RNA motifs. *Nat Chem Biol* 2010 ; 6(1): 22-4.
- [169] Mery E, Jouve E, Guillermet S, *et al.* Intraoperative fluorescence imaging of peritoneal dissemination of ovarian carcinomas. A preclinical study. *Gynecol Oncol* 2011; 122(1): 155-62.

## 13 Objectifs

Le premier volet de cette thèse a consisté en l'étude du comportement de deux polymérases utilisées en SELEX face à des matrices utilisées dans le cadre de la purification d'ADNs<sub>b</sub> par génération de produits PCR de brins de longueur inégale.

Le second et principal volet a été le développement de nouveaux outils pour le diagnostic et la thérapie du cancer épithélial ovarien. Des sélections d'aptamères ADN ont été effectuées contre le biomarqueur membranaire Mucine16 (par Cell-SELEX) et contre les facteurs pro-angiogéniques IL-6 (par Filter-Binding SELEX) et IL-8 (CE-SELEX et Filter-Binding SELEX). Après des clonages classiques pour identifier les séquences enrichies, nous avons procédé à un séquençage haut-débit des sous-librairies obtenues au cours de ces SELEX.

Nous avons également étudié les capacités de ciblage d'un aptamère décrit et caractérisé sur des cellules en culture. Nous avons étudié la capacité de l'aptamère anti-Mucine1 à marquer des cellules cultivées en flasque et sous forme de sphéroïde 3D. Le marquage a été comparé à celui obtenu avec un anticorps anti-Mucine1. La capacité de pénétration du modèle 3D a plus spécialement été étudiée avec l'aptamère et l'anticorps rendus fluorescents.



## Résultats

---

Les résultats seront présentés en abordant en premier lieu les techniques nécessaires aux réalisations des SELEX puis les données obtenues pour chacun des SELEX et en dernier lieu l'utilisation d'un aptamère décrit.

## 1 Problématique de Purification du Simple Brin à partir des Banques ADN

### 1.1 « $\alpha,\beta$ -D-constrained nucleic acids are strong terminators of thermo-stable DNA polymerases in polymerase chain reaction », article publié dans le journal PLoSOne en 2011.

L'utilisation d'une banque ADN lors d'un SELEX nécessite de générer une quantité importante (100 à 200 pmoles) d'ADNsb en fin de cycle afin de procéder à l'interaction qui débutera le suivant. Plusieurs méthodes permettent de générer ces ADNsb copies des séquences éluées de la cible : la PCR asymétrique (Gyllensten & Erlich 1988), la digestion par une exonucléase (Higuchi & Ochman 1989; Hultman et al. 1989), la séparation sur billes couplées à la streptavidine (Espelund et al. 1990) et l'électrophorèse de produits PCR de longueurs inégales (Williams & Bartel 1995; Silveira & Orgel 1995) (section Introduction-7.4).

Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de « chimie nucléique » (Jean-Marc Escudier), nous avons exploré la capacité de deux ADN polymérase utilisées en PCR à incorporer des nucléotides face à une matrice de flexibilité anormale. Nous avons utilisé deux types de molécules au sein de la matrice ADN de rigidités différentes pour explorer le comportement des polymérase et le mécanisme selon lequel agissent les terminateurs de polymérisation. L'incorporation de 2 unités de triéthylèneglycol phosphate au sein d'une amorce de PCR permet de stopper la polymérisation du brin complémentaire au niveau de ces modification. L'absence de base de ses « résidus » et la grande flexibilité apportée au squelette ribo-phosphate entraînent un décrochage de la polymérase et donc l'arrêt de la réplication. A l'opposé, nous avons incorporé 1 ou 2 unités de dithymidine CNA (Constrained Nucleic Acids) au sein de la matrice pour observer le comportement des polymérase face à une forte rigidification de la matrice. Le CNA est composé de

deux thymidines dont les bases azotées et les sucres ne sont pas modifiés mais une liaison phosphodiester est formée entre la position 5' du sucre et le phosphate. Cette liaison non-naturellement observée induit une restriction conformationnelle du squelette ribo-phosphate au niveau des liaisons  $\alpha$  et  $\beta$  pour le stéréocontrôler en anneau dioxaphosphorane. Cette courbure permet de stabiliser l'ADN en structure en épingle à cheveux (Dupouy et al. 2006; Dupouy et al. 2010) et induire une rigidité entre les deux thymidines (Dupouy et al. 2008).

C'est donc dans l'optique d'utiliser des amorces « antisens » contenant des terminateurs de polymérisation que nous avons entrepris cette étude. Nous avons étudié le comportement de deux ADN polymérases, la *Taq* ADN polymérase et la *Pfu* ADN polymérase face à 3 terminateurs différents : l'incorporation de deux unités de TriEthylèneGlycol (TEG) dans le squelette osidique de l'amorce et d'un ou deux CNA contigus dans la séquence. Les CNA induisent des contraintes structurales fortes visant à déstabiliser la fixation de la polymérase et à induire l'arrêt de la polymérisation. Nous avons amplifiés une matrice avec ces différentes amorces « antisens », contrôlé la taille des amplicons sur gel et cloné puis séquencé les produits obtenus afin d'identifier les incorporations effectuées par ces deux enzymes face aux modifications.

# $\alpha,\beta$ -D-Constrained Nucleic Acids Are Strong Terminators of Thermostable DNA Polymerases in Polymerase Chain Reaction

Olivier Martínez<sup>1,2,9</sup>, Vincent Ecochard<sup>1,2,9</sup>, Sabrina Mahéo<sup>1,2</sup>, Grégori Gross<sup>1,2</sup>, Pierre Bodin<sup>1,2</sup>, Justin Teissié<sup>1,2</sup>, Jean-Marc Escudier<sup>3</sup>, Laurent Paquereau<sup>1,2\*</sup>

**1** Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Unité Mixte de Recherche 5089, Centre National de la Recherche Scientifique, Toulouse, France, **2** Université Paul Sabatier Toulouse III, Faculté des Sciences et d'Ingénierie, Toulouse, France, **3** Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique, Unité Mixte de Recherche 5068, Centre National de la Recherche Scientifique, Toulouse, France

## Abstract

( $S_{C5'}$ ,  $R_p$ )  $\alpha,\beta$ -D-Constrained Nucleic Acids (CNA) are dinucleotide building blocks that can feature either B-type torsional angle values or non-canonical values, depending on their 5'C and P absolute stereochemistry. These CNA are modified neither on the nucleobase nor on the sugar structure and therefore represent a new class of nucleotide with specific chemical and structural characteristics. They promote marked bending in a single stranded DNA so as to preorganize it into a loop-like structure, and they have been shown to induce rigidity within oligonucleotides. Following their synthesis, studies performed on CNA have only focused on the constraints that this family of nucleotides introduced into DNA. On the assumption that bending in a DNA template may produce a terminator structure, we investigated whether CNA could be used as a new strong terminator of polymerization in PCR. We therefore assessed the efficiency of CNA as a terminator in PCR, using triethylene glycol phosphate units as a control. Analyses were performed by denaturing gel electrophoresis and several PCR products were further analysed by sequencing. The results showed that the incorporation of only one CNA was always skipped by the polymerases tested. On the other hand, two CNA units always stopped proofreading polymerases, such as *Pfu* DNA polymerase, as expected for a strong replication terminator. Non-proofreading enzymes, e.g. *Taq* DNA polymerase, did not recognize this modification as a strong terminator although it was predominantly stopped by this structure. In conclusion, this first functional use of CNA units shows that these modified nucleotides can be used as novel polymerization terminators of proofreading polymerases. Furthermore, our results lead us to propose that CNA and their derivatives could be useful tools for investigating the behaviour of different classes of polymerases.

**Citation:** Martínez O, Ecochard V, Mahéo S, Gross G, Bodin P, et al. (2011)  $\alpha,\beta$ -D-Constrained Nucleic Acids Are Strong Terminators of Thermostable DNA Polymerases in Polymerase Chain Reaction. PLoS ONE 6(10): e25510. doi:10.1371/journal.pone.0025510

**Editor:** Jörg Langowski, German Cancer Research Center, Germany

**Received:** June 11, 2010; **Accepted:** September 7, 2011; **Published:** October 3, 2011

**Copyright:** © 2011 Martínez et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Financial support for this project was provided by the Conseil Régional de la Région Midi-Pyrénées under grant number 08004695. The authors are grateful to Plateforme de synthèse d'oligonucléotides modifiés de l'Interface Chimie Biologie de l'ITAV de Toulouse for providing facilities for oligonucleotides synthesis. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: Laurent.Paquereau@ipbs.fr

<sup>9</sup> These authors contributed equally to this work.

## Introduction

The ability of the different thermostable DNA polymerases to perform synthesis using either modified DNA templates or modified nucleotides as precursors is a subject of considerable interest. Indeed, there is a rich literature concerning the bypass and/or the incorporation of non-natural DNA nucleotides. These modified nucleotides have been used to analyse the active site of DNA polymerase by insertion kinetics experiments, to protect nucleic acids against nuclease digestion, to perform mutagenesis, or to generate terminator structures. The modifications studied concern the sugar moiety (e.g., 1,5-Anhydrohexitol Nucleotides [1], Glycerol-Nucleoside Triphosphates (GNA) [2,3],  $\alpha$ -L-Threo-furanosyl Nucleic Acids (TNA) [4,5], 4'-acetylated thymidine triphosphate [6], Cyclohexenyl Nucleic Acid (CeNA) [7], Locked Nucleic Acid (LNA) [8,9], and 2',4'-Bridged Nucleotide Acids (BNA) [10,11]) or the base moiety (e.g., non-polar nucleotide

analogues [12], abasic sites [13], and cage nucleotides [14,15]). Some of these modified nucleotides were described as terminators of replication and their ability to stop polymerisation differed depending on the DNA polymerase used. *In vitro*, particularly in PCR experiments, the most common and the strengthened terminator is a non-nucleotide terminator composed of two successive triethylene glycol phosphate units incorporated within one of the two primers in a central position [16]. This primer will therefore have a tripartite composition (5' lengthener-terminator-complementary sequence). These non-nucleotide terminators were designed to generate two strands that significantly differ in length and which can therefore be readily purified by gel electrophoresis.

One of the research domains in which these terminators are of particular interest is the selection of DNA aptamers. This selection is performed by systematic evolution of ligands by exponential enrichment, which is termed the SELEX method [17,18]. Several techniques focused on easily and efficiently purifying the sense

single-stranded DNA for each run of selection. The most common methods used are asymmetric PCR [19], lambda exonuclease digestion [20], magnetic separation with streptavidin-coated beads [21], and denaturing polyacrylamide gel electrophoresis [16]. Each of these methods has their specific drawbacks, although all, with the exception of purification by gel electrophoresis, are unable to ensure that purification of only the sense single-strand DNA was performed. Modification of the length of one strand obtained in PCR remains the most suitable means to obtain the desired single strand, even if the efficiency of the extraction of the single strand from the gel remains a limitation of this approach.

In the present study, we were focused on a class of recently described nucleotides, the ( $S_{C5'}$ ,  $R_P$ )  $\alpha,\beta$ -D-CNA TT (CNA). The nucleobase and the sugar structure are unmodified in these CNA, which represent a new class of nucleotide with specific chemical and structural characteristics. CNA are dinucleotide building blocks that can feature either B-type torsional angle values or non-canonical values, depending on their 5'C and P absolute stereochemistry (Fig. 1) [22,23]. CNA display the *gauche* (+) conformation for the  $\alpha$  torsional angle, which can induce destabilization of a duplex [24] as well as promote marked bending in a single-stranded DNA to preorganize it into a loop-like structure [25]. The conformational restriction of the phosphodiester linkage, by its transformation into a neutral stereocontrolled dioxaphosphorinane ring structure, stabilized DNA hairpin structures [26,27] and induced rigidity within oligonucleotides [28].

We hypothesized that bending in the template may produce a terminator structure, and we tested whether CNA could be used as a new strong terminator of polymerization in PCR. We showed that a double CNA repeat completely stops thermostable DNA polymerases whereas one CNA is skipped. Our results also lead us to propose that CNA and their derivatives could be useful tools for investigating the behaviour of the different classes of polymerases.

## Results

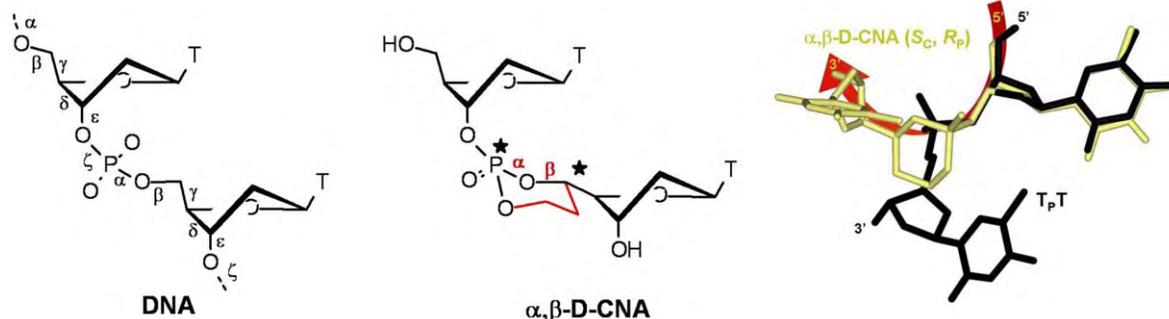
### One $\alpha,\beta$ -D-CNA TT unit is skipped by DNA polymerases

We investigated CNA within reverse primers as a potential terminator able to block the elongation of the sense strand in a PCR reaction. Two different DNA polymerases, either possessing (*Pfu* DNA polymerase) or lacking (*Taq* DNA polymerase) proofreading activity were used in PCR. Each polymerase was tested in the same PCR conditions on an arbitrary 78 bp template (Fig. 2A) with different reverse primers. In this experiment, the forward primer was  $^{32}P$  labeled at the 5' extremity to detect only

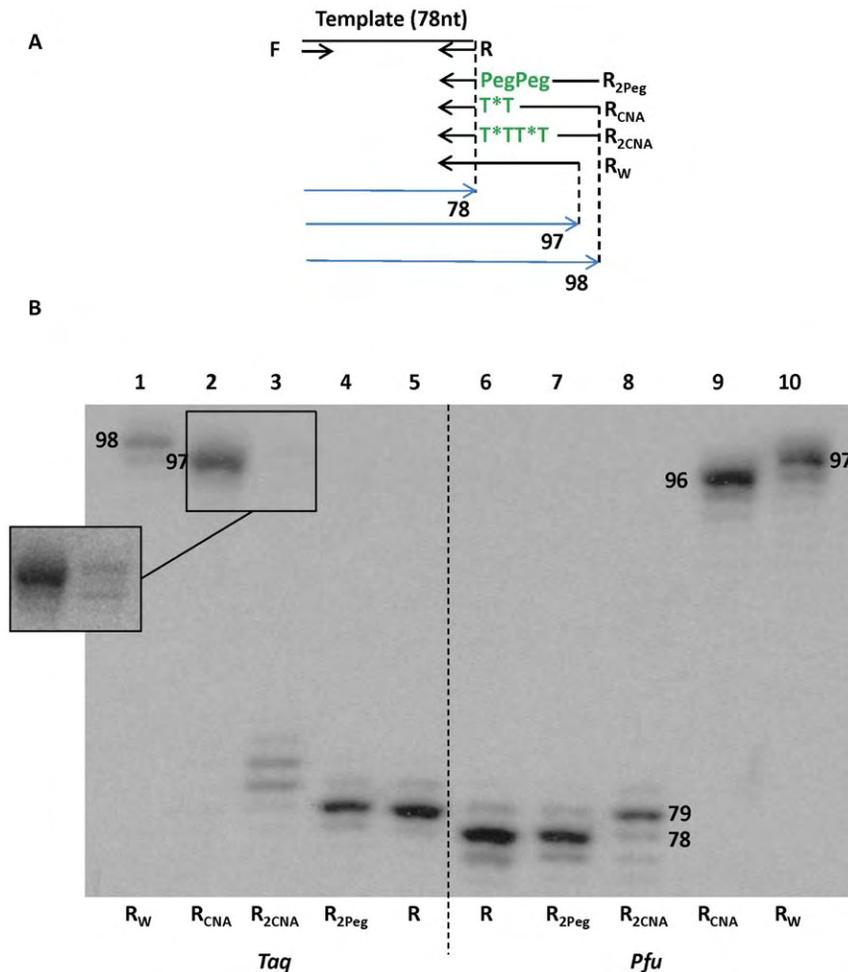
the sense strand and PCR products were analyzed using denaturing acrylamide gel electrophoresis. Three PCR controls were performed with three different reverse primers: a short reverse primer included in the template (primer R), a longer reverse primer without modification (primer  $R_W$ ), and the primer  $R_{2peg}$  containing a terminator composed of two successive triethylene glycol phosphate units. PCR amplification with primer R gave a main signal of 79 nt with the *Taq* DNA polymerase (Fig. 2B, lane 5) and 78 nt with *Pfu* DNA polymerase (Fig. 2B, lane 6). As expected, *Pfu* DNA polymerase synthesised a product corresponding exactly to the length of the template whereas *Taq* DNA polymerase added an extra nucleotide to the 3' end with its terminal transferase activity (*i.e.* the ability to add an extra base – usually an adenine – at the 3' ends independently of the template). Some additional bands were visible with a very low intensity and correspond to  $n-1$  and  $n+1$  fragments (see discussion). When the  $R_W$  primer was used, the addition of an extra nucleotide to the 3' end of the PCR product was also observed with the *Taq* DNA polymerase (Fig. 2B, lane 1) but not with the *Pfu* DNA polymerase (Fig. 2B, lane 10). These different behaviours of the polymerases have been widely reported in the literature [29,30,31]. The third PCR control experiment was performed with the primer  $R_{2peg}$  (Fig. 2B, lanes 4 and 7). As expected, both DNA polymerases were never able to bypass this terminator. The results obtained with these three control primers clearly confirmed that the “polishing” activity of *Pfu* DNA polymerase was efficient on blunt and 3' recessed ends. In contrast, an extra-nucleotide was systematically added with *Taq* DNA polymerase, as a 79 nt fragment was mainly obtained.

To test the polymerisation activity of each DNA polymerase in the presence of CNA, we incorporated one CNA into a central position of the reverse primer (Primer  $R_{CNA}$ ). A single PCR product was observed with the two enzymes (Fig. 2B, lanes 2 and 9). In both cases the polymerases were able to bypass the modification introduced into the  $R_{CNA}$  reverse primer. The *Pfu* DNA polymerase synthesized a 96 nt fragment, suggesting that the enzyme was able to skip the CNA otherwise the fragment would have been 98 nt long (Fig. 2A). With the *Taq* DNA polymerase, the amplicons had a length of 97 nt. This suggests that *Taq* DNA polymerase was also able to skip this modification and the supplementary nucleotide was only due to the terminal transferase activity of this enzyme.

To precisely analyse the fragments generated by each polymerase, we cloned and sequenced the sense single-strand DNA. PCR products were loaded onto a denaturing acrylamide gel and extracted (Figure S1). We thus set up a cloning strategy to



**Figure 1. Structural constraints in ( $S_{C5'}$ ,  $R_P$ )  $\alpha,\beta$ -D-CNA TT.** Left: the six backbone torsion angles (labelled  $\alpha$  to  $\zeta$ ) of nucleic acids. Middle: the  $\alpha,\beta$ -D-CNA TT dinucleotide in which  $\alpha$  and  $\beta$  are stereocontrolled by a dioxaphosphorinane ring structure. Right: superimposition of the X-ray crystallography structure of unmodified TpT (black) [40] and NMR structure of ( $S_{C5'}$ ,  $R_P$ )  $\alpha,\beta$ -D-CNA TT (gold). doi:10.1371/journal.pone.0025510.g001



**Figure 2. CNA as terminator of polymerization.** A) Set of primers used for each PCR. Forward primer was  $^{32}\text{P}$  labelled to detect only the sense strand. The lengths of the PCR products expected are indicated. B) Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis obtained for each set of primers with *Taq* DNA polymerase (1–5) and *Pfu* DNA polymerase (6–10). For each polymerase, the PCR were performed with different reverse primers:  $\mathbf{R}_W$  (lanes 1, 10);  $\mathbf{R}_{CNA}$  (lanes 2, 9);  $\mathbf{R}_{2CNA}$  (lanes 3, 8);  $\mathbf{R}_{2Peg}$  (lanes 4, 7);  $\mathbf{R}$  (lanes 5, 6). The length of the main fragments is indicated. Inset: gel overexposed.

doi:10.1371/journal.pone.0025510.g002

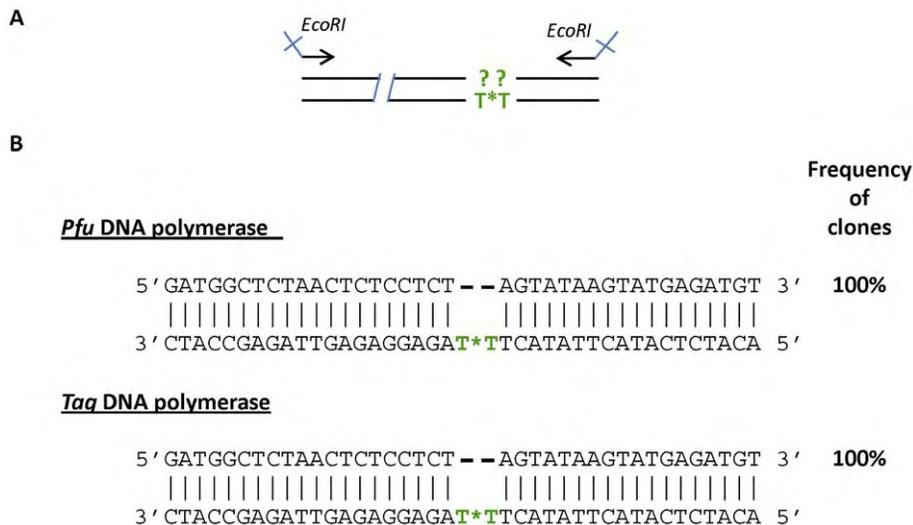
precisely determine which nucleotides were skipped by polymerases in front of the CNA (Fig. 3A). A second PCR was thus performed with primers carrying restriction sites and surrounding the position of the CNA. The reverse primer was chosen so as not to be just after the position of the CNA and the PCR was performed with the same DNA polymerase as the one used during the first PCR. The sequencing (Fig. 3B) confirmed that both enzymes were able to skip the modification introduced into the antisense strand without adding any nucleotide opposite to the CNA. Thus, the structural constraint of the template strand did not block the enzymes, and this single CNA was constantly bypassed.

### Two successive $\alpha,\beta$ -D-CNA TT units display strong terminator activity

The structural constraint introduced by a single CNA was not sufficient to block polymerases, and we therefore introduced two successive CNA units spaced by one phosphodiester bond into the reverse primer (Primer  $\mathbf{R}_{2CNA}$ , Fig. 2A). Using this reverse primer, the two enzymes displayed completely different behaviours. *Pfu*

DNA polymerase was never able to read-through this modification and a unique main signal was detected (Fig. 2B, lane 8). This PCR product was 79 nt long indicating that *Pfu* DNA polymerase incorporated a supplementary nucleotide compared with the product length obtained with the  $\mathbf{R}_{2Peg}$  primer. This addition could be due to the incorporation of a nucleotide in front of the thymidine of the CNA or to the terminal transferase activity of this enzyme which was not compensated by its proofreading activity on this kind of template. However, the insertion of two successive CNA generates a structural constraint which completely stopped the *Pfu* DNA polymerase, as we observed with the two triethylene glycol phosphate units as terminator.

*Taq* DNA polymerase synthesized elongated fragments of different lengths (Fig. 2B, lane 3). With a longer exposure of the gel, a signal can be detected near 98 nt (Fig. 2B, inset). This weak signal indicated that *Taq* DNA polymerase could occasionally synthesize a full-length fragment and consequently that the structural constraint introduced by the two CNA was not sufficient to completely stop this enzyme. Thus the two CNA units inserted into the  $\mathbf{R}_{2CNA}$  reverse primer displayed dual effects on the behaviour of *Taq* DNA polymerase; either the enzyme passed



**Figure 3. Sequences of sense single-strand DNA obtained with  $R_{CNA}$ .** A) Schematic representation of the PCR realized for cloning. The same DNA polymerase was used in this second PCR than in the first PCR. EcoRI sites incorporated for cloning were indicated. B) Sequences obtained for each polymerase with the  $R_{CNA}$  primer.

doi:10.1371/journal.pone.0025510.g003

through the modification or the two CNA terminated polymerization. When this structural constraint was perceived as a terminator by the enzyme, the end point of polymerization spreads out over several nucleotides (Fig. 2B).

The contrasting behaviour between *Taq* DNA polymerase and *Pfu* DNA polymerase with the  $R_{2CNA}$  primer was confirmed by sequencing the single-strand DNA. The sense single strands of DNA were purified on a denaturing acrylamide gel (Figure S1). The strategy used for cloning was to ligate the sense single-strand DNA, and thereby generate concatemers independently from the stop point of the enzyme. These concatemers were then amplified by PCR with primers surrounding the position of ligation (Fig. 4A) and these PCR products were cloned and sequenced (Fig. 4B). With *Pfu* DNA polymerase only two kinds of sequence were found. As shown in Figure 2B, the main product is 79 nt long, and this length increase corresponded to the addition of one adenosine to the 3' end of these fragments. However, a few clones did not present this supplementary nucleotide. *Taq* DNA polymerase systematically incorporated in front of the two CNA units (Fig. 4B). A few nucleotides were then usually incorporated, and in all cases an extra nucleotide was added to the 3' end of the fragment due to the strong terminal transferase activity of *Taq* DNA polymerase. The maximum length of fragment obtained by cloning was 85 nt and the predominant fragments were between 80 and 82 nt (Fig. 2B). Each single-strand DNA product was cloned three times but the proportion of the various sequences obtained varied greatly from one cloning to the other. We therefore did not extract any statistics from these results and only present the different sequences obtained (see discussion).

## Discussion

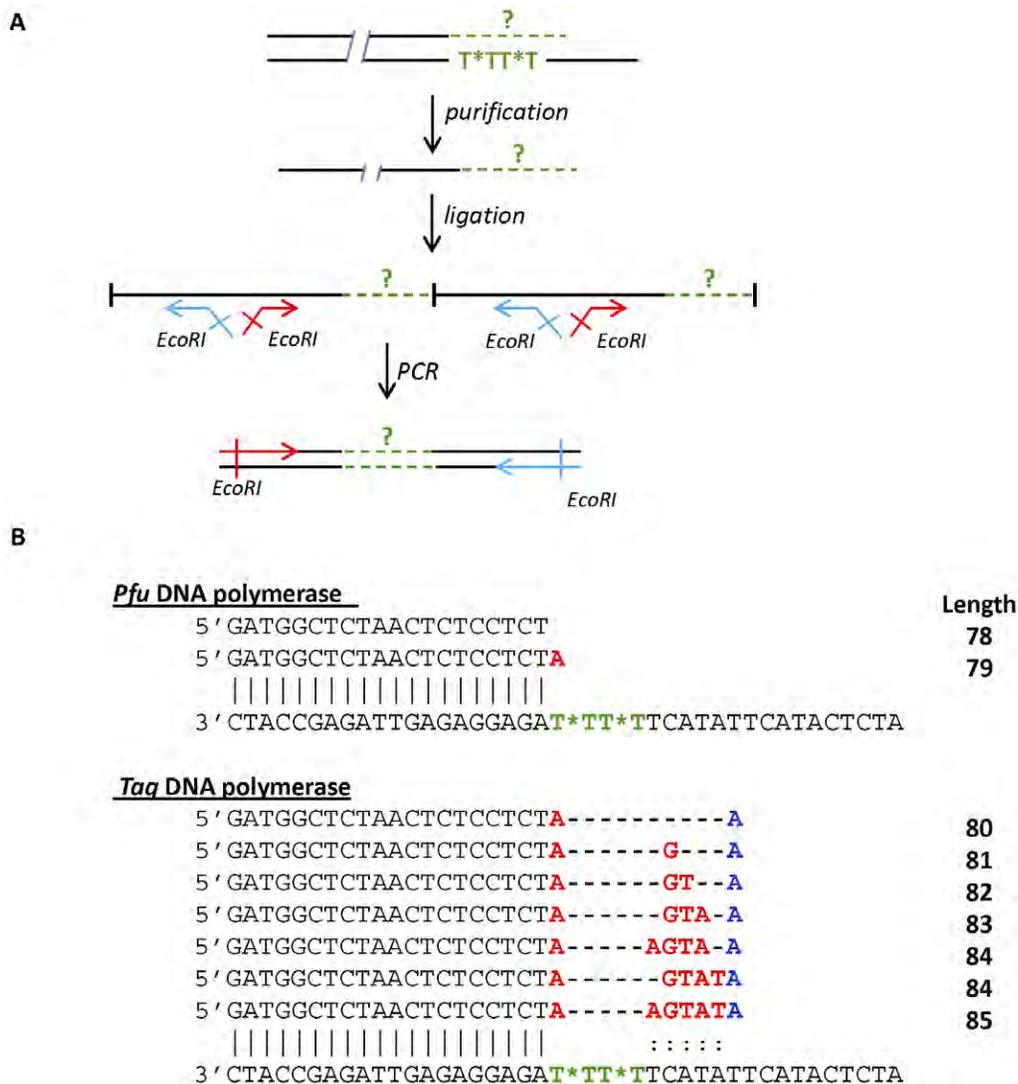
We investigated the conformational constraints within single-stranded DNA as a template for DNA polymerases. For this purpose, we used CNA to induce bending in the template. Since they were first synthesized [22], no published work has reported the functional impact of CNA on the behaviour of DNA polymerases. We used two different thermostable DNA polymerases in PCR: *Pfu* DNA polymerase and *Taq* DNA polymerase. The

former is a classical enzyme used in PCR for its proofreading activity. It has the lowest error rate of all the commonly used thermostable polymerases [30] and its high-fidelity amplification capacity is provided by its 3'→5' exonuclease activity (also known as polishing activity [29]). The *Taq* DNA polymerase catalyzes highly accurate DNA synthesis *in vitro*, despite lacking a 3'→5' proofreading exonuclease activity [31].

To check for the potential terminator function of CNA we performed PCR using a forward primer labelled with  $^{32}P$  on its 5' end to detect only the sense strand with a high sensitivity. With this method, some additional bands were visible with a very low intensity in all conditions tested (Fig. 2B) and correspond to  $n-1$  and  $n+1$  fragments. These  $n+1$  fragments were obtained during the chemical synthesis of long fragments, especially when guanines were incorporated and this modification of length corresponded to a GG dimer formation. Over the large number of couplings in the synthesis of long oligonucleotides, this can lead to a significant  $n+1$  peak. As with the  $n-1$  compounds, these  $n+1$  fragments were difficult to separate from the full-length oligonucleotides (<http://www.glenresearch.com//GlenReports/GR21-211.html>).

Regardless of proofreading activity, introduction of a single CNA unit within the template induced a conformational stress that was sufficient for both polymerases to bypass the two thymidines. CNA can form loop-like structures [27,32] and it is clear that the DNA polymerases systematically skip this loop. The mechanism involved in this skipping is unlikely to be a slippage since the template sequence used in our study does not correspond to any of the previously published slippage conditions. In fact, replication slippage [33,34] is a mechanism that can occur in frameshift mutations of homopolymeric sequences [35] and in deletions between short or long directly repeated sequences [36,37]. It has been previously shown that thermostable DNA polymerases induce deletions on hairpin structures by a process termed "polymerization across" [38]. We suggest that the same mechanism is involved with the loop-like structure generated with CNA.

When two CNA units are introduced into the reverse primer, the behaviour of the two classes of polymerases differs. The *Pfu* DNA polymerase is completely blocked by this modification, as it



**Figure 4. Sequences of sense single-strand DNA obtained with R<sub>2</sub>CNA.** A) Schematic representation of the strategy used for cloning. The sense single strand DNA were purified and ligated with RNA ligase. A second PCR was performed with forward (red) and reverse (blue) primers surrounding the position of ligation. These PCR products were then cloned and sequenced. B) Sequences obtained for each polymerase with the R<sub>2</sub>CNA primer. The nucleotides corresponding to the terminal transferase activity of *Taq* DNA polymerase are indicated in blue and incorporation of nucleotides is shown in red. The length of these fragments is indicated.  
doi:10.1371/journal.pone.0025510.g004

does with two triethylene glycol phosphate units. The only difference between these two terminators is that one adenosine is incorporated in front of the CNA. The best yields in chemical synthesis of these CNA are obtained with thymidine as a nucleobase. It was thus very difficult to test nucleotides other than thymidine in these CNA. However, the results obtained with *Taq* DNA polymerase convincingly demonstrate that the incorporation of the additional adenosine by *Pfu* DNA polymerase is due to the presence of one T in the CNA rather than the terminal transferase activity of this enzyme. The sequencing results show that this addition is not systematic and that a small proportion of PCR products were stopped without any supplementary 3' end addition. We did not try to quantitatively express the proportions for each kind of PCR product. Indeed, these clonings were performed several times and a bias was observed since the fraction cloned with adenosine does not reflect the percentage synthesized and observed on the acrylamide gel. We therefore have not

presented any statistical data deduced from these clonings and simply report the nature of the sequences obtained. These clonings were performed with a concatemerization step which consists of a ligation between the single strands. Our analyses of this bias lead us to propose two possible hypotheses: the efficiency of this ligation either depends on the 3' donor, or, for a reason that we are unable to identify, the cloned fraction does not reflect the actual percentage synthesized. These two CNA units thus demonstrate a novel strong terminator activity when a proofreading enzyme such as *Pfu* DNA polymerase is used in PCR.

In contrast, with a non-proofreading enzyme such as *Taq* DNA polymerase, CNA in tandem does not behave as a strong terminator in PCR; *Taq* DNA polymerase never stops precisely at the site of modification, but a few nucleotides later, or more rarely at the end of the template. *Taq* DNA polymerase maintained its activity beyond this modification, whereas *Pfu* DNA polymerase did not. We suggest that this difference of

behaviour may be due to the “tightness” and rigidity of the active site of these two polymerases [39]. It follows that, CNA and their derivatives are potentially useful analytical tools to study DNA polymerase behaviour. It would be particularly interesting to study the effects of varying the distance between the two CNA. Finally, similar to abasic triethylene glycol phosphate units, a tandem CNA is a strong terminator in PCR when using a proofreading enzyme such as *Pfu* DNA polymerase. Our results provide the first example of a sugar/phosphate backbone constraint that impacts on enzymatic activity without modifying the nucleobase nature or the sugar structure on single-stranded DNA.

## Materials and Methods

All oligonucleotides were purchased from Sigma-Genosys (St. Quentin Fallavier, France), except for primers containing,  $\alpha,\beta$ -D-CNA and PEG (DMT triethyloxy glycol amidite, GeneCust, Dudelange, Luxembourg), which were synthesized by J-M E. [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP (6000 Ci/mmol) was purchased from Perkin Elmer (Courtaboeuf, France). *Pfu* DNA polymerase was purchased from Promega (Madison, USA). Recombinant *Taq* DNA polymerase was produced and purified by LP. T4 RNA ligase was purchased from Fermentas (supplied by Euromedex, Mundolsheim, France). All other enzymes were purchased from New England Biolabs (Ozyme, St-Quentin-en-Yvelines, France). Cogenics (Meylan, France) performed DNA sequencing.

### Synthesis of can

The synthesis of ( $S_{C5'}$ ,  $R_p$ )  $\alpha,\beta$ -D-Constrained Nucleic Acids has been previously reported [22]. In the primer sequences,  $\alpha,\beta$ -D-CNA TT is indicated as T\*T and triethylene glycol phosphate unit is indicated as Peg. Incorporation of ( $S_{C5'}$ ,  $R_p$ )  $\alpha,\beta$ -D-CNA TT was verified by MALDI-TOF MS (Data not shown).

### Polymerase Chain Reaction

The PCR reaction mixtures were prepared in a total volume of 50  $\mu$ L. For each DNA polymerase (1.5units), the same conditions were used: 250  $\mu$ M of each dNTP, 0.5  $\mu$ M of reverse and forward primers (Table 1), 40 nM of DNA template (T: 5'-GGTATT-GAGGGTTCGCATCTGGGGGGGATGTATTCTGGGGGGT-TGGGCCGGGGTCCCCGGATGGCTCTAACTCTCTCT-3', 78mer) in the appropriate reaction buffer [ $10\times$  *Pfu* buffer: 200 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1% TritonX-100 and 1 mg/mL nuclease-free BSA.  $10\times$  *Taq* buffer: 100 mM Tris-HCl (pH 8,3 at 25°C), 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% gelatine.]. Forward primer was end-labelled by T4 polynucleotide kinase with ATP- $\gamma$   $^{32}$ P, and then purified by size exclusion using Microspin G-25 columns (GE Healthcare). Amplifications were performed on GeneAmp<sup>®</sup> PCR system 9700 from Applied Biosystems, with the following parameters: 94°C 2 min (94°C 30 s; 60°C 20 s; 72°C 10 s) for 30 cycles, followed by an extension step at 72°C for 1 min. PCR products were loaded onto denaturing urea-polyacrylamide gel and migration was performed at constant power (20 W). The gel was dried and exposed using Kodak Biomax film overnight at room temperature.

### Purification of (+) strand ssDNA

PCR products were loaded onto denaturing urea-polyacrylamide gel and strands of unequal length were separated by electrophoresis and purified. Samples were prepared in  $2\times$  denaturing loading buffer (20 mM EDTA, 0.05% Xylene cyanol, prepared in 95% formamide), heated for 5 minutes at 95°C and transferred onto ice to prevent annealing. Electrophoresis was

**Table 1.** Sequences of the primers used in PCR.

Primer	Sequence
F	5'-GGTATTGAGGGTTCGCATC-3'
R	5'-AGAGGAGAGTTAGGCCATC-3'
R <sub>W</sub>	5'-ACATCGCATACTTATACTAGAGGAGAGTTAGGCCATC-3'
R <sub>CNA</sub>	5'-ACATCTCATACTTATACTT*TAGAGGAGAGTTAGGCCATC-3'
R <sub>2CNA</sub>	5'-ATCTCATACTTATACTT*TT*TAGAGGAGAGTTAGGCCATC-3'
R <sub>2Peg</sub>	5'-ATCTCATACTTATACTPegPegAGAGGAGAGTTAGGCCATC-3'

$\alpha,\beta$ -D-CNA TT is indicated by T\*T and triethylene glycol phosphate unit by Peg in the primer sequences. The modification of lengths due to the insertion of  $\alpha,\beta$ -D-CNA TT or triethylene glycol phosphate unit in primers R<sub>CNA</sub> and R<sub>2CNA</sub> correspond to the addition of 2, and 4 nucleotides equivalent, respectively. doi:10.1371/journal.pone.0025510.t001

carried out in a 10% polyacrylamide (19:1)-7M urea gel prepared in TBE  $1\times$  (100 mM Tris pH 8.4, 90 mM Boric acid and 1 mM EDTA). A pre-run of 30 minutes at constant power (25 W) was performed before denatured samples were loaded and electrophoresed at constant power (20 W) for  $\approx$ 40 minutes. Gels were stained with ethidium bromide (0.5  $\mu$ g/ml) and DNA was visualized under UV light.

To purify the band corresponding to the strand (+), DNA was excised and eluted for 2 h 65°C in 300  $\mu$ L of TAE  $1\times$  and purified using DNA gel extraction kit (Millipore) and quantified at 260 nm.

### Ligation of (+) strand ssDNA

(+) strand ssDNA, obtained with R<sub>2CNA</sub> and R<sub>2Peg</sub> reverse primers, was purified and 5'-phosphorylated using T4 polynucleotide kinase. The reaction mixtures were prepared in a final volume of 10  $\mu$ L with 4  $\mu$ L of gel-extracted ssDNA (20–40 ng), ATP 1 mM, BSA 0.1 mg.mL<sup>-1</sup>, 10 U T4 PNK in T4 RNA ligase buffer  $1\times$ , then incubated at 37°C for 1 h. The 5'-P ssDNA fragments were concatemered at 16°C overnight in a total volume of 11  $\mu$ L by the addition of 1 U T4 RNA ligase.

### PCR generation of EcoRI-anted fragments from purified ssDNA amplified with R<sub>2Peg</sub> or R<sub>2CNA</sub> reverse primers

PCR using EcoRI forward and reverse primers (Table 2) were performed in a total reaction volume of 50  $\mu$ L with *Taq* Pol buffer or *Pfu* buffer containing each primer (0.5  $\mu$ M), each dNTP (250  $\mu$ M), 4  $\mu$ L of ssDNA concatemers and 1.5 U of the corresponding polymerase. 30 PCR cycles of 30 s at 94°C, 20 s at 60°C and 10 s at 72°C were performed. A final extension was then carried out for 1 min at 72°C.

**Table 2.** Sequences of the primers used for cloning.

Primer	Sequence	Length
EcoRI forward primer	5'-ATCGGAATTCGGGATGTATTCTGGG-3'	25mer
EcoRI reverse primer	5'-TACGGAATTCGCCAGATCGCACCC-3'	25mer
EcoRI <sub>CNA</sub> forward primer	5'-ATCGATCATCGAATTCGGTATTGAGGGTTCGCATC-3'	34mer
EcoRI <sub>CNA</sub> reverse primer	5'-TACGGAATTCACATCTCATACTTA-3'	24mer

EcoRI digestion sites are underlined. doi:10.1371/journal.pone.0025510.t002

## PCR generation of Eco RI ended fragments amplified with $R_{CNA}$ reverse primer

PCR products obtained with  $R_{CNA}$  reverse primer were amplified by a second PCR using  $EcoRI_{CNA}$  forward and reverse primers (Table 2), without ssDNA purification. The second PCR was performed with the polymerase used in the first PCR.

## Cloning

$EcoRI$ -ended fragments were digested by  $EcoRI$  in buffer (50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 0.025% Triton X100) for 1 h at 37°C, precipitated and ligated by T4 DNA ligase into pBluescript SK<sup>-</sup> vector (Stratagene)  $EcoRI$  digested and CIP (Ozyme) dephosphorylated. The ligation reaction was transformed into XL1blue *E. coli* strain. Transformed bacteria were plated on MacConkey medium supplemented with ampicillin (100 µg/ml) and incubated overnight at 37°C.

## Supporting Information

**Figure S1 Purification of single strands DNA for cloning.** PCR products were loaded onto two low resolution denaturing acrylamide gels. After electrophoresis, one gel was transferred on Nylon membrane and hybridized with an antisense probe to localize the sense single strands of DNA. The pieces of the second gel corresponding to the hybridization area were cut and the DNA extracted for cloning. (A) Denaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis obtained for each set of primers with *Pfu* DNA polymerase and *Taq* DNA polymerase, stained with ethidium bromide. For each polymerase, the PCR were realized with different reverse primers:  $R_W$  (lanes 1, 10);  $R_{CNA}$  (lanes 2, 9);  $R_{2CNA}$  (lanes 3, 8);  $R_{2Peg}$  (lanes 4, 7);  $R$  (lane 5) (T

corresponds to the 78 bp template. The length of the main fragments is indicated. (B) Hybridization with antisense probe of gel shown in (A). Denaturing urea-polyacrylamide gels were transferred by capillarity on Nylon membrane in 20× SSC overnight at room temperature, then UV crosslinked using Spectro-linker (XL1000). The membrane was prehybridized 1 h at 60°C in Church buffer (0.5 M phosphate buffer pH 7.5, 7% SDS, 1% BSA, 1 mM EDTA). Hybridization was performed in the same buffer at 60°C overnight with 2 ng of labelled antisense probes (5'-TGGGGGGGATGTATTCTGGGGGGTTGGGCCGGGGT-CCCCG-3', 40mer). Probes were end-labelled by T4 polynucleotide kinase with ATP  $\gamma^{32}P$ , then purified by size exclusion using Microspin G-25 columns (GE Healthcare). Specific activity was evaluated at about 5  $10^8$  cpm/µg. After hybridization, the membrane was washed twice with SSC 0.2×, SDS 0.1%, 15 min at 60°C, and exposed using Kodak film Biomax overnight at room temperature. (TIF)

## Acknowledgments

We are grateful to Pr Julian Smith and Dr Evert Haanappel for their helpful comments on the manuscript. The manuscript was corrected by a specialized scientific editor (Alex Edelman & Associates, Malakoff, France).

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VE JME LP. Performed the experiments: SM OM GG PB VE. Analyzed the data: GG VE SM OM JT JME LP. Contributed reagents/materials/analysis tools: JME LP. Wrote the paper: LP VE.

## References

- Vastmans K, Pochet S, Peys A, Kerremans L, Van Aerschot A, et al. (2000) Enzymatic incorporation in DNA of 1,5-anhydrohexitol nucleotides. *Biochemistry* 39: 12757–12765.
- Chen JJ, Tsai CH, Cai X, Horhota AT, McLaughlin LW, et al. (2009) Enzymatic Primer-Extension with Glycerol-Nucleoside Triphosphates on DNA Templates. *PLoS ONE* 4(3): e4949. doi:10.1371/journal.pone.0004949.
- Tsai CH, Chen JY, Szostak JW (2007) Enzymatic synthesis of DNA on glycerol nucleic acid templates without stable duplex formation between product and template. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 14598–14603.
- Horhota A, Zou KY, Ichida JK, Yu B, McLaughlin LW, et al. (2005) Kinetic analysis of an efficient DNA-dependent TNA polymerase. *Journal of the American Chemical Society* 127: 7427–7434.
- Kempeneers V, Vastmans K, Rozanski J, Herdewijn P (2003) Recognition of threosyl nucleotides by DNA and RNA polymerases. *Nucleic Acids Research* 31: 6221–6226.
- Marx A, Spichty M, Amacker M, Schwitler U, Hubscher U, et al. (1999) Probing interactions between HIV-1 reverse transcriptase and its DNA substrate with backbone-modified nucleotides. *Chemistry and Biology* 6: 111–116.
- Kempeneers V, Rinders M, Froeyen M, Herdewijn P (2005) Investigation of the DNA-dependent cyclohexenyl nucleic acid polymerization and the cyclohexenyl nucleic acid-dependent DNA polymerization. *Nucleic Acids Research* 33: 3828–3836.
- Veedu RN, Vester B, Wengel J (2007) Enzymatic incorporation of LNA nucleotides into DNA strands. *Chembiochem* 8: 490–492.
- Veedu RN, Vester B, Wengel J (2008) Polymerase chain reaction and transcription using locked nucleic acid nucleotide triphosphates. *J Am Chem Soc* 130: 8124–8125.
- Kuwahara M, Obika S, Takeshima H, Hagiwara Y, Nagashima J, et al. (2009) Smart conferring of nuclease resistance to DNA by 3'-end protection using 2',4'-bridged nucleoside-5'-triphosphates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19: 2941–2943.
- Kuwahara M, Obika S, Nagashima J, Ohta Y, Suto Y, et al. (2008) Systematic analysis of enzymatic DNA polymerization using oligo-DNA templates and triphosphate analogs involving 2',4'-bridged nucleosides. *Nucleic Acids Research* 36: 4257–4265.
- Potapova O, Chan C, DeLucia AM, Helquist SA, Kool ET, et al. (2006) DNA polymerase catalysis in the absence of Watson-Crick hydrogen bonds: Analysis by single-turnover kinetics. *Biochemistry* 45: 890–898.
- Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP (1997) Translesional synthesis on DNA templates containing a single abasic site - A mechanistic study of the "A rule". *Journal of Biological Chemistry* 272: 13916–13922.
- Tanaka K, Kuzuya A, Komiyama M (2008) Site-selective termination of DNA replication by using a caged template. *Chemistry Letters* 37: 584–585.
- Tanaka K, Katada H, Shigi N, Kuzuya A, Komiyama M (2008) Site-selective blocking of PCR by a caged nucleotide leading to direct creation of desired sticky ends in the products. *Chembiochem* 9: 2120–2126.
- Williams KP, Bartel DP (1995) PCR product with strands of unequal length. *Nucleic Acids Res* 23: 4220–4221.
- Ellington AD, Szostak JW (1990) In vitro Selection of Rna Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature* 346: 818–822.
- Tuerk C, Gold L (1990) Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment - Rna Ligands to Bacteriophage-T4 DNA-Polymerase. *Science* 249: 505–510.
- Gyllenstein UB, Erlich HA (1988) Generation of Single-Stranded-DNA by the Polymerase Chain-Reaction and Its Application to Direct Sequencing of the Hla-Dqa Locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 7652–7656.
- Higuchi RG, Ochman H (1989) Production of Single-Stranded-DNA Templates by Exonuclease Digestion Following the Polymerase Chain-Reaction. *Nucleic Acids Research* 17: 5865–5865.
- Espelund M, Stacy RAP, Jakobsen KS (1990) A Simple Method for Generating Single-Stranded-DNA Probes Labeled to High Activities. *Nucleic Acids Research* 18: 6157–6158.
- Le Clezio I, Escudier JM, Vigroux A (2003) Diastereoselective synthesis of a conformationally restricted dinucleotide with predefined alpha and beta torsional angles for the construction of alpha,beta-constrained nucleic acids (alpha,beta-CNA). *Org Lett* 5: 161–164.
- Le Clezio I, Gornitzka H, Escudier JM, Vigroux A (2005) Constrained nucleic acids (CNA). Part 2. Synthesis of conformationally restricted dinucleotide units featuring noncanonical alpha/beta/gamma or delta/epsilon/zeta torsion angle combinations. *J Org Chem* 70: 1620–1629.
- Dupouy C, Le Clezio I, Lavedan P, Gornitzka H, Escudier JM, et al. (2006) Diastereoselective Synthesis of Conformationally Restricted Dinucleotides Featuring Canonical and Noncanonical / Torsion Angle Combinations (alpha-beta D-CNA). *Eur J Org Chem*: 5515.
- Dupouy C, Payrastra C, Escudier JM (2008) Cyclic phospho di- and triester as structural elements of nucleic acids. *Targets in Heterocyclic Systems: Chemistry*

- and Properties; Attanasi OA, Spinelli D, eds. Società Chimica Italiana: Rome 12: 185–211.
26. Dupouy C, Iche-Tarrat N, Durrieu MP, Rodriguez F, Escudier JM, et al. (2006) Watson-Crick base-pairing properties of nucleic acid analogues with stereo-controlled alpha and beta torsion angles (alpha,beta-D-CNAs). *Angew Chem Int Ed Engl* 45: 3623–3627.
  27. Dupouy C, Millard P, Boissonnet A, Escudier JM (2010) Alpha,beta-D-CNA preorganization of unpaired loop moiety stabilizes DNA hairpin. *Chem Commun (Camb)* 46: 5142–5144.
  28. Dupouy C, Iche-Tarrat N, Durrieu MP, Vigroux A, Escudier JM (2008) Alpha,beta-D-CNA induced rigidity within oligonucleotides. *Org Biomol Chem* 6: 2849–2851.
  29. Costa GL, Weiner MP (1994) Polishing with T4 or Pfu Polymerase Increases the Efficiency of Cloning of Pcr Fragments. *Nucleic Acids Research* 22: 2423–2423.
  30. Cline J, Braman JC, Hogrefe HH (1996) PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* 24: 3546–3551.
  31. Eckert KA, Kunkel TA (1990) High Fidelity DNA-Synthesis by the Thermus-Aquaticus DNA-Polymerase. *Nucleic Acids Research* 18: 3739–3744.
  32. Le Clezio I, Dupouy C, Lavedan P, Escudier JM (2007) Synthesis and Structure of an alpha,beta -D-CNA Featuring Noncanonical / Torsion Angle Combination Within a Tetranucleotide. *Eur J Org Chem* 23: 3894–3900.
  33. Viguera E, Canceill D, Ehrlich SD (2001) In vitro replication slippage by DNA polymerases from thermophilic organisms. *Journal of Molecular Biology* 312: 323–333.
  34. Garcia-Diaz M, Kunkel TA (2006) Mechanism of a genetic glissando: structural biology of indel mutations. *Trends in Biochemical Sciences* 31: 206–214.
  35. Streisinger G, Okada Y, Emrich J, Newton J, Tsugita A, et al. (1966) Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 31: 77–84.
  36. Tran HT, Degtyareva NP, Koloteva NN, Sugino A, Masumoto H, et al. (1995) Replication Slippage between Distant Short Repeats in *Saccharomyces-Cerevisiae* Depends on the Direction of Replication and the Rad50 and Rad52 Genes. *Molecular and Cellular Biology* 15: 5607–5617.
  37. Feschenko VV, Lovett ST (1998) Slipped misalignment mechanisms of deletion formation: Analysis of deletion endpoints. *Journal of Molecular Biology* 276: 559–569.
  38. Cariello NF, Thilly WG, Swenberg JA, Skopek TR (1991) Deletion Mutagenesis During Polymerase Chain-Reaction - Dependence on DNA-Polymerase. *Gene* 99: 105–108.
  39. Kim TW, Brieba LG, Ellenberger T, Kool ET (2006) Functional evidence for a small and rigid active site in a high fidelity DNA polymerase: probing T7 DNA polymerase with variably sized base pairs. *J Biol Chem* 281: 2289–2295.
  40. Camerman N, Fawcett JK, Camerman A (1976) Molecular structure of a deoxyribose-dinucleotide, sodium thymidyl-5' yields to 3'-thymidylate-(5') hydrate (pTpT), and a possible structural model for polythymidylate. *J Mol Biol* 107: 601–621.

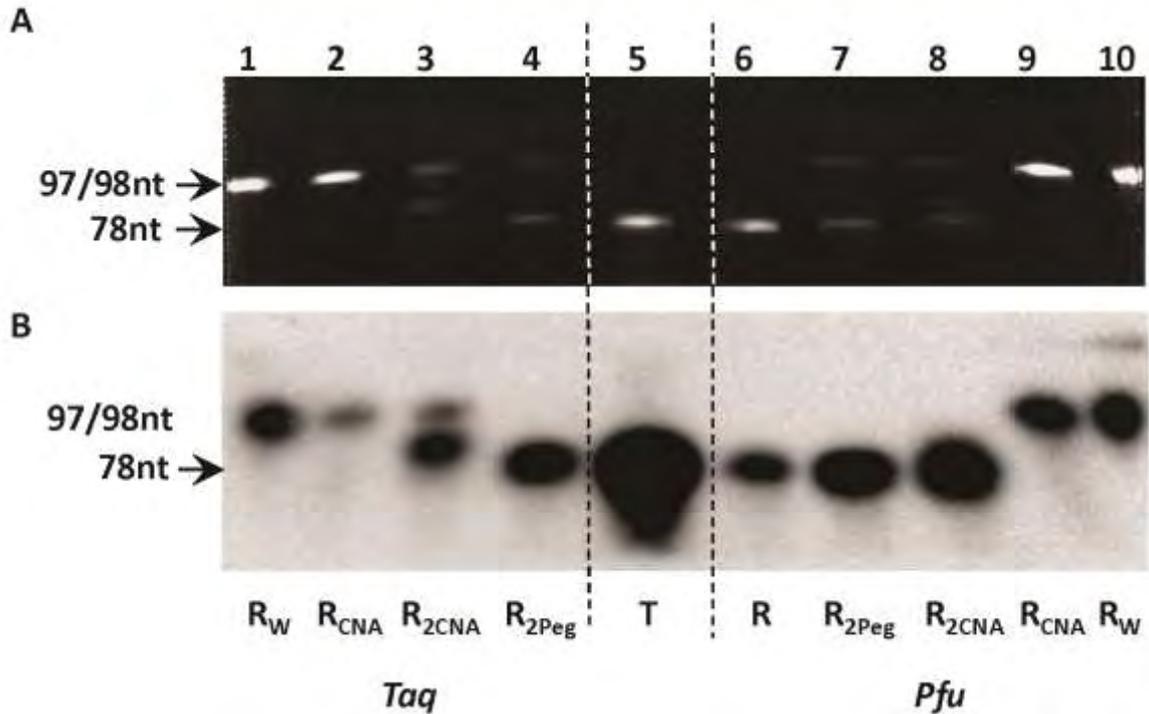


Figure S1.: **Purification of single strands DNA for cloning.** PCR products were loaded onto two low resolution denaturing acrylamide gels. After electrophoresis, one gel was transferred on Nylon membrane and hybridized with an antisense probe to localize the sense single strands of DNA. The pieces of the second gel corresponding to the hybridization area were cut and the DNA extracted for cloning. (A) Denaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis obtained for each set of primers with *Pfu* DNA polymerase and *Taq* DNA polymerase, stained with ethidium bromide. For each polymerase, the PCR were realized with different reverse primers:  $R_W$  (lanes 1, 10);  $R_{CNA}$  (lanes 2, 9);  $R_{2CNA}$  (lanes 3, 8);  $R_{2Peq}$  (lanes 4, 7);  $R$  (lane 6). Lane 5 (T) corresponds to the 78 bp template. The length of the mains fragments is indicated. (B) Hybridization with antisense probe of gel shown in (A). Denaturing urea-polyacrylamide gels were transferred by capillarity on Nylon membrane in 20x SSC over night at room temperature, then UV crosslinked using Spectrolinker (XL1000). The membrane was prehybridized 1 h at 60°C in Church buffer (0.5 M phosphate buffer pH 7.5, 7% SDS, 1% BSA, 1 mM EDTA). Hybridization was performed in the same buffer at 60°C overnight with 2 ng of labelled antisense probes (5'-TGGGGGGGATGTATTCTGGGGGGTTGGGCCGGGGTCCCCG-3', 40mer). Probes were end-labelled by T4 polynucleotide kinase with ATP  $\gamma^{32}P$ , then purified by size exclusion using Microspin G-25 columns (GE Healthcare). Specific activity was evaluated at about  $5 \cdot 10^8$  cpm/ $\mu$ g. After hybridization, the membrane was washed twice with SSC 0.2x, SDS 0.1%, 15 min at 60°C, and exposed using Kodak film Biomax over night at room temperature.

**Problématique de Purification du Simple Brin à partir de Banques**

La considération de ces résultats dans l'optique d'utiliser de telles molécules dans le cadre d'un SELEX mène à choisir l'utilisation combinatoire d'une enzyme à activité 3'→5' exonucléase, la *Pfu* ADN polymérase et des amorces « antisens » comprenant deux unités de Triéthylèneglycol comme terminateurs forts de la polymérisation.

L'utilisation d'un seul CNA ne suffit pas à stopper la polymérisation et l'utilisation de 2 CNA contigus entraîne l'incorporation de bases supplémentaires en 3' du brin sens « aptamérique ». Cette activité terminal transférase peut poser problème dans le cadre d'un SELEX car elle entraîne la modification de la séquence primaire sélectionnée et donc la possibilité de modifier sa structuration et potentiellement empêcher la reconnaissance de la cible.

La principale limitation à l'utilisation de cette méthode pour purifier le simple-brin aptamérique restera néanmoins la réalisation efficace de l'extraction de l'ADNs<sub>b</sub> à partir du gel de polyacrylamide.

**1.2 Données non publiées sur la contrainte induite par 2 modifications terminatrices de polymérisation espacées dans la matrice**

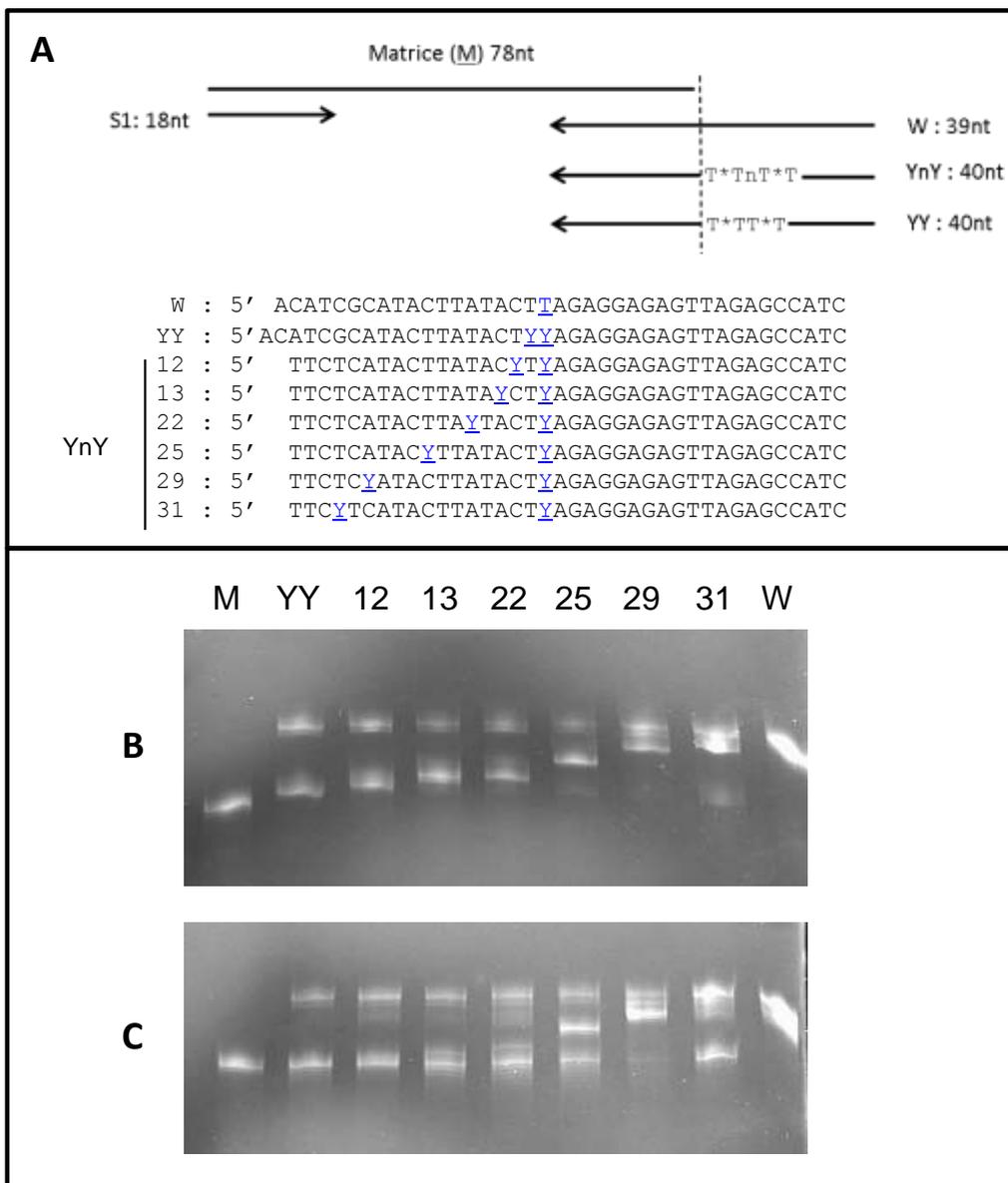
Nous nous sommes ensuite intéressé au comportement des polymérases face à une matrice comportant 2 CNA (chaque CNA est symbolisé par un Y) non contigus, espacés de n=1 à n=13 bases (**Figure 13A**).

L'étude du comportement des enzymes face à l'espacement croissant des Y (amorces YnY) n'a pas été menée à son terme. La *Taq* est capable de polymériser sur quelques bases derrière la double modification YY dans la matrice comme vu précédemment. Il est donc logique qu'elle puisse passer également sur les YnY. Cependant, on observe une faible proportion de brins « sens » de petite taille (60 à 65 nts) y compris lorsque les Y sont séparés de 13nt, ce qui signifie que la polymérisation peut être stoppée après le 1<sup>er</sup> Y rencontré même lorsque le second est éloigné d'une dizaine de bases (**Figure 13B**). La *Taq* peut majoritairement continuer la polymérisation derrière le premier Y mais va s'arrêter après le 2<sup>nd</sup>, montrant que la présence du deuxième Y même éloigné de 13 nts arrête la

### Problématique de Purification du Simple Brin à partir de Banques ADN

polymérisation de cette enzyme. D'après les intensités de bandes observées, l'interprétation peut être la suivante : La *Taq* peut passer sur le premier Y alors qu'au niveau du second, la contrainte déjà présente dans la matrice s'additionne à la nouvelle contrainte rencontrée pour provoquer l'arrêt de la polymérisation.

Les résultats obtenus avec la *Pfu* ne permettent pas d'avancer d'interprétation (**Figure 13C**). Un séquençage des brins complémentaires « sens » générés face à ces matrices YnY permettrait de vérifier la théorie avancée pour le comportement de la *Taq* et de nous informer sur celui qu'adopte la *Pfu*.



**Figure 13 : Comportement des ADN polymérases *Taq* et *Pfu* face à des matrices YnY. (A) schéma de la PCR et tableau des amorces W, YY et YnY utilisées. (B) Gel**

*dénaturant poly-acrylamide des produits de PCR Taq. (C) Gel dénaturant de poly-acrylamide des produits de PCR Pfu.*

La technique de préparation de l'ADNsb par des produits PCR de longueur inégale a été utilisée lors des SELEX contre l'IL-8. Les produits ADNdb ont été obtenus à partir de 10 tubes de 50 µL de produit PCR et purifiés sur gel de polyacrylamide dénaturant urée. Ceci a permis de générer 100 pmoles d'ADNsb à chaque cycle pour procéder au cycle suivant de SELEX.

Les rendements de purifications n'ont pas été déterminés en ce qui concerne cette méthode de purification d'ADNsb. Cependant il a été plusieurs fois observé que l'ADNsb ait été perdu entre l'excision du gel et la reprise du précipitat après extraction mécanique. Ceci est peut être dû à la trop faible concentration de matériel ADNsb qui réduit sensiblement l'efficacité de la précipitation éthanolique. Ceci rend le processus relativement aléatoire quant à l'obtention d'ADNsb.

Ces problèmes liés à l'extraction d'ADN à partir de gel de polyacrylamide sont relatés dans la littérature (section Introduction-[7.4](#)).

Pour pallier à ce problème de quantité d'ADNsb avant précipitation, nous avons procédé pour le SELEX IL-6 et le Cell-SELEX à des PCR en cascade et une purification d'ADNsb sur colonne d'affinité streptavidine. Cette technique de purification étant nettement moins efficace, la quantité de produits PCR ADNdb à obtenir est plus importante. La PCR en cascade permet d'augmenter la quantité de produits PCR et ainsi limiter les problèmes lors de la précipitation.

## **2 SELEX IL-8**

Il n'y a pas de méthode générique pour la sélection d'aptamères et dans la plupart des cas le succès du SELEX semble dépendre des conditions utilisées lors de la sélection (Daniels et al. 2003). La sélection d'un aptamère dépend des propriétés de la cible, de sa disponibilité et de sa pureté.

La chimiokine IL-8 a été initialement identifiée comme activatrice des neutrophiles et comme facteur chimio-attractant (Yoshimura 1987). Elle joue de multiples rôles comme cytokine pro-inflammatoire par l'activation et le chimiotactisme de différents types cellulaires immuns (Skov & Beurskens 2008). L'inhibition de l'IL-8 dans les tumeurs solides pourrait contrer la progression tumorale par diminution de l'angiogénèse, de la croissance des cellules tumorales et de la transition épithélio-mésenchymateuse (Waugh & Wilson 2008; Gabellini et al. 2009). Il a été démontré que beaucoup de types de carcinomes humains (mammaire, colo-rectal, gastrique, pulmonaire et ovarien entre autres) expriment de forts taux d'IL-8 par comparaison aux tissus sains (Waugh & Wilson 2008). De plus, plusieurs études cliniques sur des mélanomes, des cancers du sein, de l'ovaire, de la prostate, du colon et de l'ovaire ont montré une corrélation directe entre le taux sérique d'IL-8 et la progression de la maladie (Xie 2001).

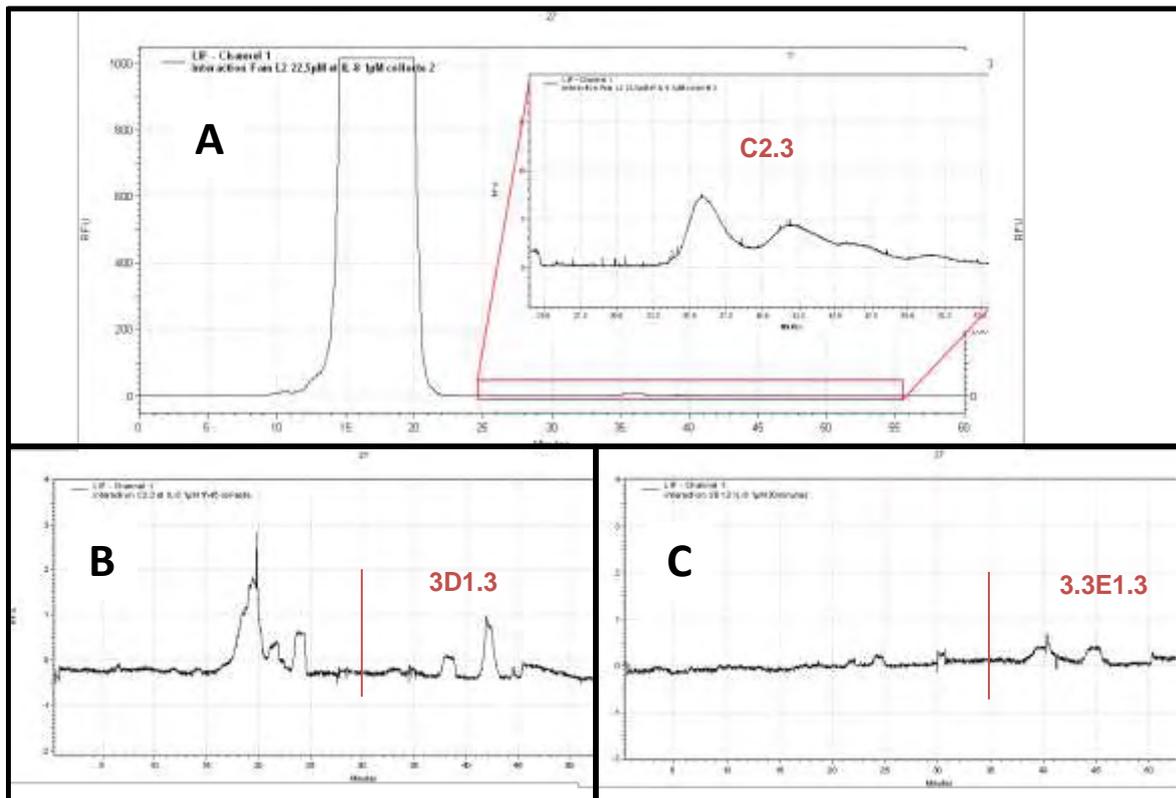
Nous avons choisi de sélectionner des aptamères contre l'IL-8 humaine par deux procédés différents de partitionnement : l'électrophorèse capillaire et la filtration sur membrane de nitrocellulose. Ces procédés de partitionnement ont été choisis car ils ne nécessitent pas d'immobilisation de la cible. Les séquences sélectionnées ont été clonées et celles issues du Filter-Binding SELEX ont également été séquencées par la méthode haut-débit. Une IL-8 commerciale a été utilisée pour cette sélection (PeProTech).

## 2.1 Non-SELEX par électrophorèse capillaire

### 2.1.1 *Sélection*

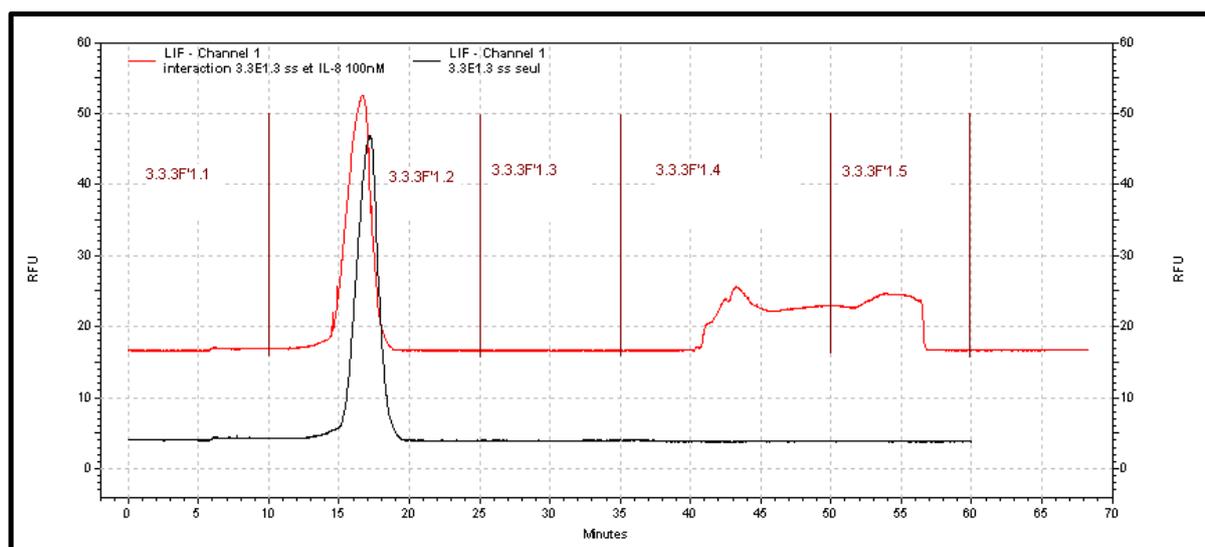
Le CE-SELEX a été effectué selon la procédure de non-SELEX (Berezovski et al. 2006) sur 3 cycles puis couplé à un cycle de SELEX classique. Le non-SELEX est une sélection sans étape d'amplification PCR : Les séquences sélectionnées au cycle n sont éluées de la cible après partitionnement et directement remises en interaction avec la cible au cycle n+1.

Après 20 minutes d'interaction entre la librairie et la cible IL-8, le mélange est injecté en électrophorèse capillaire et le temps de migration des séquences est déterminé par mesure de la fluorescence due au passage des ADNsb marqués à la fluorescéine devant la cellule de détection LIF. Lors de la première injection de Non-SELEX, un pic majoritaire correspondant au temps de migration de la librairie seule est observé (à 17 minutes) puis des pics minoritaires sont collectés dans la fraction C2.3 (**Figure 19A**). La concentration en IL-8 est réajustée dans le tube de collecte puis le mélange est réinjecté lors du cycle 2 de Non-SELEX. Les pics sortants après le temps de migration standard de la librairie sont collectés (**Figure 19B**) puis un 3<sup>ème</sup> cycle de Non-SELEX est effectué (**Figure 19C**). La limite de détection de l'appareil étant quasiment atteinte, nous avons choisi d'amplifier les séquences pour procéder à un cycle de CE-SELEX classique.



**Figure 19 : Non-SELEX contre IL-8.** (A) *Electrophorogrammes de l'interaction entre la librairie2 et l'IL-8. L'agrandissement correspond à la fraction collectée C2.3 contenant les pics d'interaction.* (B) *Electrophorogramme de l'interaction entre la sous-librairie C2.3 et l'IL-8 réinjectée sans amplification après réajustement de la concentration de l'échantillon en IL-8. Les pics d'interaction observés sont collectés dans la fraction 3D1.3.* (C) *Electrophorogramme de l'interaction entre la sous-librairie 3D1.3 et l'IL-8 suivant le même procédé de Non-SELEX. Les pics d'interaction observés sont collectés dans la fraction 3.3E1.3 pour amplification par PCR (couplage SELEX après 3 cycles de non-SELEX).*

Après amplification et purification des ADNsb « sens », la sous-librairie est injectée seule pour contrôler son temps de migration puis après interaction avec la cible (**Figure 20**). La sous-librairie observe un temps de migration semblable à celui de la librairie naïve avec un pic à 17 minutes. Les séquences migrant après ce pic majoritaire sont collectées puis clonées pour être séquencées.



**Figure 20 :** Electrophorégrammes de la sous-librairie amplifiée 3.3E1.3 avant et après interaction avec IL-8. La sous-librairie 3.3E1.3 (tracé noir) migre dans des temps similaires à la banque naïve (**Figure 19**). La mise en interaction de la sous-librairie avec l'IL-8 entraîne la migration tardive d'une grande fraction des séquences (tracé rouge).

### 2.1.2 Clonage

Les séquences collectées dans les fractions 3.3.3F'1.4 et 3.3.3F'1.5 (**Figure 20**) ont été amplifiées par PCR avec une amorce « sens » avec une queue flottante EcoRI et une amorce « antisens » avec une queue flottante BamHI. Les séquences issues de la fraction 3.3.3F'1.4 sont nommées 4.x et celles de la fraction 3.3.3F'1.5 sont nommées 5.x (**Figure 21**). L'alignement multiple des séquences ne permet pas de mettre en évidence de motifs partagés. Ceci peut s'expliquer par le faible enrichissement de séquences obtenu par la méthode que nous avons employé, seulement une étape d'amplification a été réalisée.

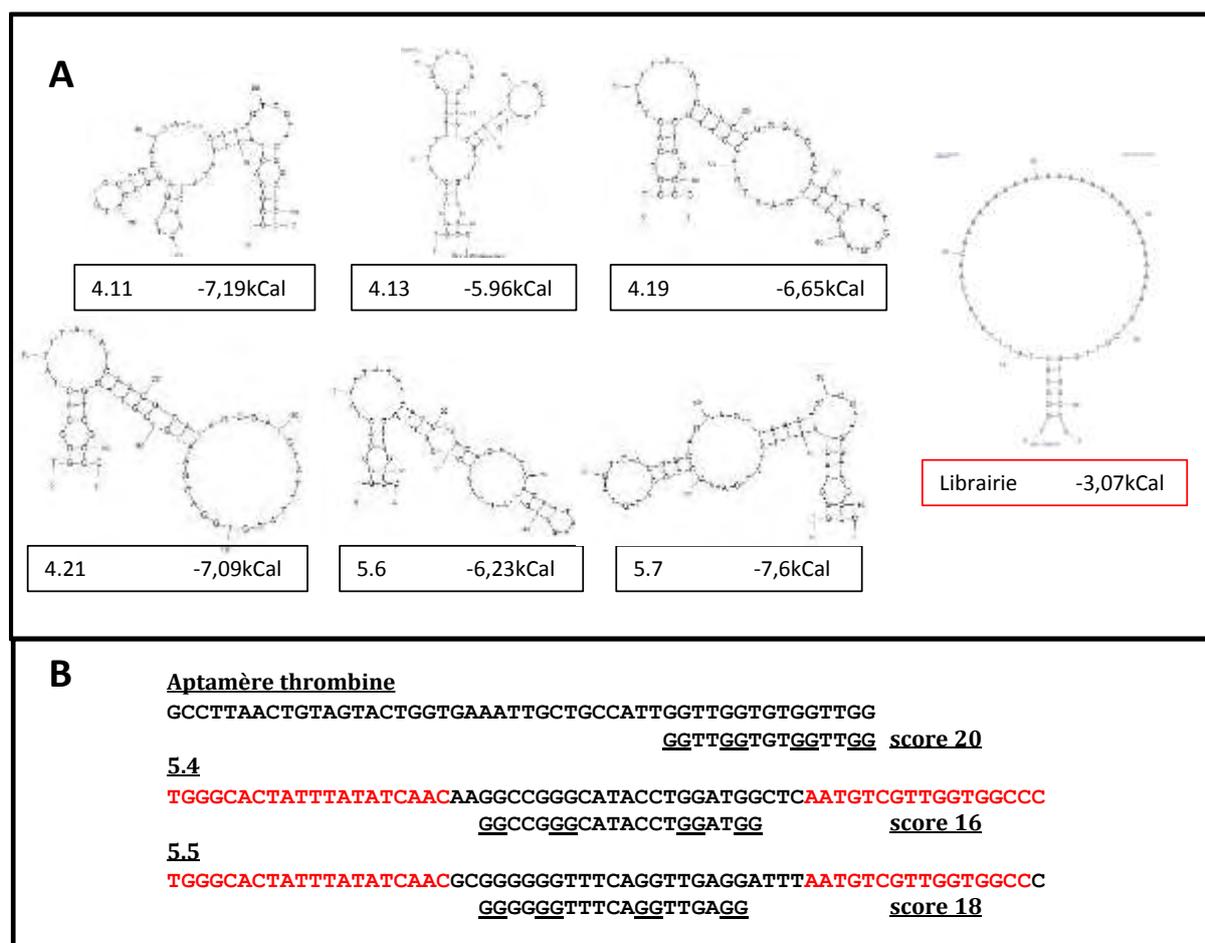
```

5.26      --GTAGAGAGAT--AATCAAAGAGACATA-
5.24      --TTTGGGTTAGCTAAATAAGGG--GCGC-
5.14      --GGCCGCAAGATAAGGTAAGTAAAGTC----
4.29      GAGGGGGCAC----AAGAAGTAGGGTATA-
4.3       ----ACGCAAACCAATCAATGCAGGCTTC-
5.6       -----CCACACAGCAACATTAAGATGTATG
5.4       AAGGCCGGGCATACCTGGATGGCTC-----
4.13      AAGTGGGGATATCGATATATTGCAT-----
4.21      -----GCATAGCGATGTATTTAGGTGGAGG
4.24      ---GGGGCTGCGTTTG-GGTGAATGTGCG-
5.18      ----GGGGCTCGACACAGGAGGGAAAGTA-
4.19      --GGGGCGAGAGTTTGTGGGAG--AACTG-
5.5       ----GCGGGGGGTTTCAGGTTGAGGATTT-
4.5       ---GTCTGTTTCTAAA-TCCAAAGTGTTG-
5.8       -----AATAAAGGAAA-GGAGTAGAGCAAAG
4.6       ---GGGGCTCCGTTAA-GCGATCTAATGG-
4.30      ---GGGGGACCGGCAA-GCTATATTTCAA-
4.9       ----GCTGAAGAGCGTTGCT-CCCTCTTAC-
5.9       ----GCCGATGTAGTGACGGCAGTAGTTA-
4.11      ----TGTGAGGCGGTGTGCGCCATGATTA-
5.20      -----CTGAGGGTGTGCCGGGTGGTCTTAG-
5.16      ---GTCGGTGTGCGACGGCA-CGATACAA-
5.10      ---GTGGGAGGCAAAGAGGG-TCTCAGTG-
5.21      ----CCGGAGGCGGAAGGGG-TCCGACCAG-

```

**Figure 21 : Alignement ClustalW des séquences issus du CE-SELEX IL-8.** Les séquences clonées à partir des fractions 3.3.3F'1.4 et 3.3.3F'1.5 (notées respectivement 4.x et 5.x) sont alignées à la recherche d'identités entre les séquences.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux structures pour voir si des similarités peuvent être observées entre les séquences. Des prédictions de structures ont été effectuées par Mfold et par QGRS Mapper (section Introduction-11.2.1). Les prédictions Mfold montrent que la plupart de séquences isolées par CE-SELEX sont capables d'adopter une structuration forte par la formation de tige-boucles (**Figure 22A**). Nous observons la présence de 2 séquences (5.4 et 5.5) pouvant adopter une structure en G-quadruplex (**Figure 22B**), ce *scaffold* (échafaudage) est rencontré dans un certain nombre d'aptamères dont l'aptamère anti-thrombine.



**Figure 22 : Prédications de structures des séquences clonées après CE-SELEX contre l'IL-8.** Les structures secondaires de quelques-unes des séquences clonées ont été prédites par le programme Mfold (A) et par QGRS Mapper (B). Le score QGRS Mapper est comparé à celui de l'aptamère thrombine.

### 2.1.3 Tests d'affinités

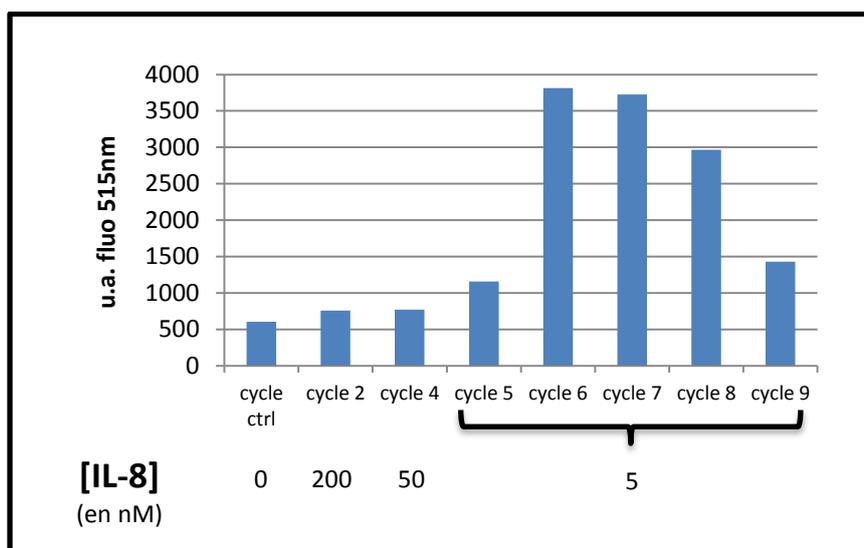
Nous avons procédé à des tests d'affinité par radioliation en Filter-Binding pour les séquences 5.4 et 5.5 mais aucune liaison spécifique n'a pu être démontrée. De même, l'injection en électrophorèse capillaire de ces séquences en présence d'IL-8 n'a pas permis de voir l'apparition de pics

N'ayant pas pu déterminer le temps de migration de l'IL-8 en électrophorèse capillaire, nous avons sélectionné les séquences sortant à des temps différents du pic de la librairie naïve en présence de la cible ; les séquences dont la mobilité électrophorétique est modifiée. La liaison de ces aptamères à la protéine IL-8 n'a pas pu être prouvée.

## 2.2 Filter-Binding SELEX contre l'IL-8

### 2.2.1 *Sélection*

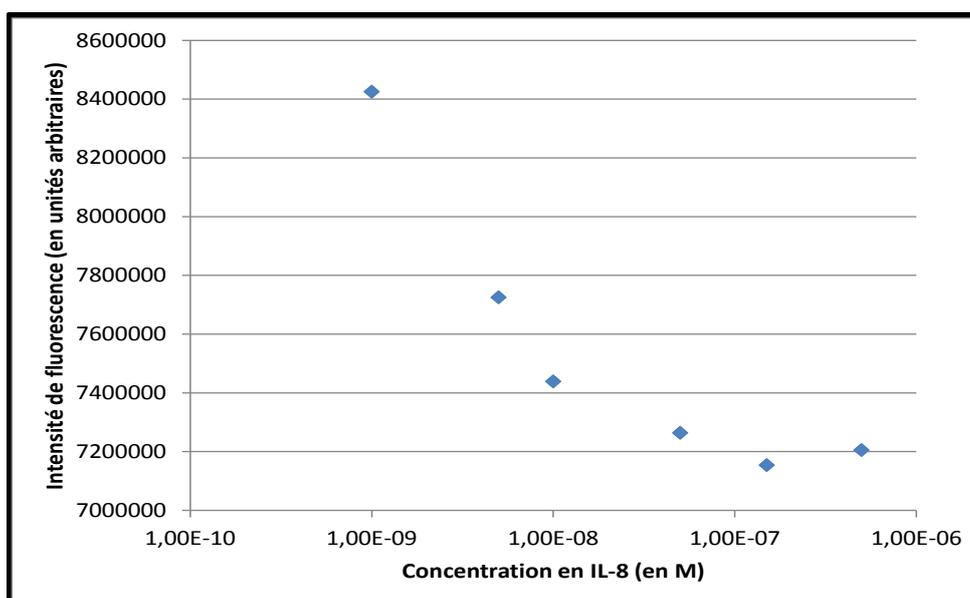
Nous avons effectué 11 cycles de SELEX contre l'IL-8 par partitionnement sur filtre de nitrocellulose. Au cours de ce processus, la concentration de la cible a été progressivement réduite pour augmenter la compétition entre les séquences et enrichir les sous-librairies en séquences de haute affinité. La librairie étant marquée à la fluorescéine en 5', nous avons pu quantifier les séquences éluées du filtre après chaque partitionnement. (**Figure 23**). Nous avons ainsi observé que le nombre de séquences sélectionnées au cycle 5 était de 50% supérieur à celui du cycle 4 alors que la quantité de cible a été dans un même temps réduit de 90%. Lors du cycle 6, nous observons 350% d'augmentation du nombre de séquences éluées comparativement au cycle précédent pour une même quantité de cible traduisant un enrichissement. Au cours des cycles suivants, le nombre de séquences sélectionnées va diminuant sans variation de la quantité de cible. Ce phénomène est parfois observé et traduit l'enrichissement des sous-librairies en séquences ne possédant pas la plus forte affinité. Ceci peut s'expliquer par les différences d'efficacité de réplication existant entre les séquences.



**Figure 23 :** Suivi de l'enrichissement au cours du SELEX contre IL-8. Les séquences éluées après le partitionnement sont dosées par mesure spectrofluorimétrie de la fluorescéine.

### 2.2.2 Interaction de la sous-librairie du cycle 6 avec la cible IL-8

La sous-librairie du cycle 6 a été testée pour son affinité pour la cible par mesure d'anisotropie de fluorescence. Nous n'avons pas observé de modification de polarisation de la fluorescence (données non montrées) en fonction de la concentration d'IL-8. Cependant, l'intensité de fluorescence émise par les séquences marquées 5'-fluorescéine de la sous-librairie diminue avec la concentration croissante d'IL-8, pouvant indiquer une interaction entre les deux partenaires et un quenching de la fluorescence dû à la liaison (**Figure 24**).



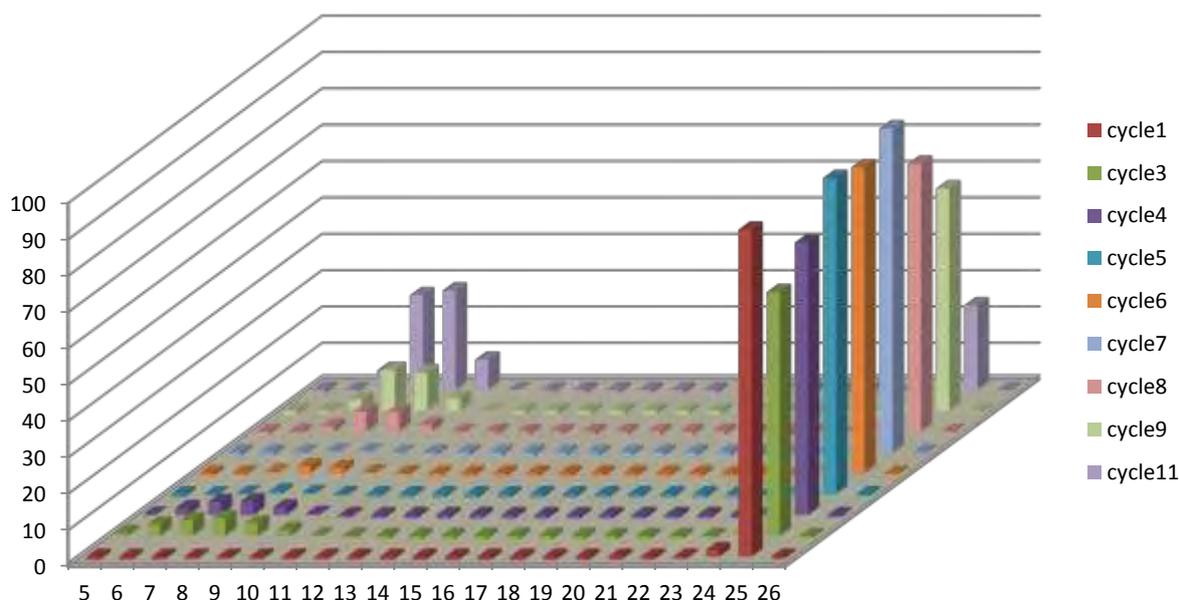
**Figure 24 :** Interactions de la sous-librairie du cycle 6 avec l'IL-8. L'intensité de fluorescence de la fluorescéine est mesurée pour différentes concentrations d'IL-8.

### 2.2.3 Séquençage haut débit

Sur les 11 cycles envoyés à séquencer contre l'IL-8, seuls 9 ont donné des résultats en séquençage (**Figure 18**).

L'analyse des séquences surreprésentées dans chaque cycle montre que les meilleures occurrences sont quasi exclusivement composées de séquences courtes avec des parties dégénérées sur seulement 6 à 10 nucléotides. Ce sont ces mêmes séquences qui présentent un enrichissement au cours de l'avancé du SELEX. L'analyse de l'occurrence moyenne des séquences de taille attendue (25 nucléotides) ne montre aucune évolution avec une occurrence moyenne de 1 du cycle 1 au cycle 11 de SELEX. Il n'y a donc pas eu d'enrichissement notable de séquences à la taille de la librairie de départ.

Nous avons cherché à déterminer quelle proportion des séquences est de taille attendue, c'est-à-dire voisine des 25 nucléotides dégénérés de la Librairie 5 (**Figure 25**). La proportion de sous-librairie pour chaque longueur de région dégénérée a été déterminée. On constate l'apparition de séquences courtes en proportion non-négligeable dès le cycle 3. A partir du cycle 5, la majorité des séquences sont de la taille souhaitée mais la forte présence de séquences courtes est à nouveau observée à partir du cycle 8. Puis leur enrichissement entraîne la diminution drastique de la proportion de séquences de taille attendue. Seulement 23% des séquences identifiées au cycle 11 possèdent une partie dégénérée de 25 nucléotides.



**Figure 25 : Evolution de la taille des séquences SELEX IL-8.** Pour chaque cycle de SELEX IL-8, la taille de la partie dégénérée des séquences de la sous-librairie est déterminée. La proportion de séquences dégénérées pour chaque taille est représentée dans chacun des 9 cycles analysés.

Bien que les séquences de taille attendue soient majoritaires jusqu'au cycle 1, nous avons constaté que les meilleures occurrences sont occupées par des séquences courtes.

Nous n'avons pas pu réaliser d'analyse MEME sur les séquences des sous-librairies. Cependant des recherches de séquences par les techniques utilisées en haut-débit ne se basant pas sur l'enrichissement semblent pertinentes (sections Introduction-10.1.4 et 10.1.5).

### **2.3 Comparaison des séquences obtenues par les deux approches CE-SELEX et Filter-Binding SELEX**

Nous avons cherché à déterminer si des séquences ont pu être sélectionnées par les deux approches de SELEX utilisées. Ceci voudrait dire que ces séquences présentent une spécificité. Chacune des séquences clonées lors du CE-SELEX ont donc été recherchées dans les sous-librairies générées par le séquençage haut-débit. Seule une séquence a pu être retrouvée dans les deux SELEX, il s'agit de la séquence nommée 5.4 en CE-SELEX. Elle est présente en faible nombre de copies dans 4 cycles de Filter-Binding SELEX : 2 fois au cycle 4, une fois au cycle 6, 4 fois au cycle 7 et une fois au cycle 11.

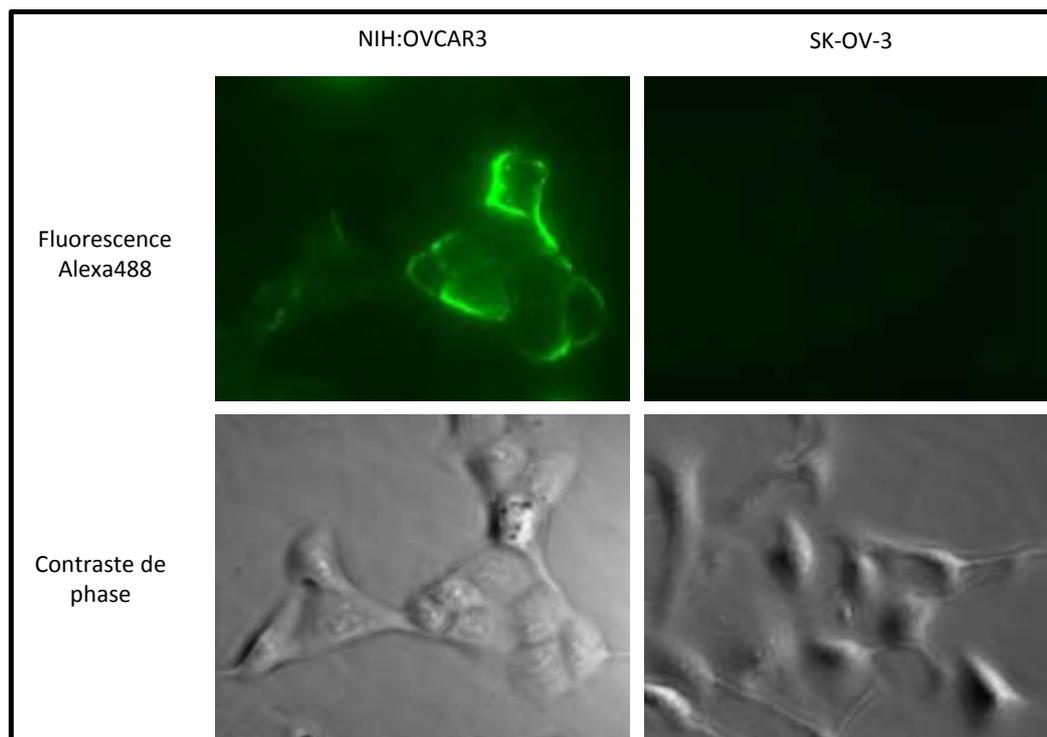
## **3 Sélection d'Aptamères Ciblant la Mucine16 :**

Des Cell-SELEX ont été appliqués pour générer des aptamères contre des biomarqueurs déjà connus (Hicke et al. 2001) mais également pour identifier de nouveaux marqueurs cellulaires (Daniels et al. 2003; Blank et al. 2001). Nous avons procédé à une sélection sur cellules afin de sélectionner des aptamères contre la Mucine16 dans son état natif, à la surface des cellules NIH:OVCAR3 qui la surexpriment.

### 3.1 Test d'expression de la Mucine16 sur les lignées cellulaires NIH:OVCAR3 et SK-OV-3

La première étape du long processus de Cell-SELEX a été de vérifier la présence de la protéine Mucine16 à la surface de nos cellules de sélection (NIH:OVCAR3) et leur absence sur les cellules pour la sélection négative (SK-OV-3). Nous avons pour cela réalisé un immunomarquage par l'anticorps Vk-8 développé par le Docteur Beatrice Yin (Memorial Sloan Kettering, New York, USA) (Lloyd et al. 1997) (**Figure 26**).

Conformément à nos attentes, les cellules NIH:OVCAR3 présentent un fort marquage à leur surface traduisant le fort taux d'expression de la protéine CA 125 dans cette lignée cellulaire alors que les cellules SK-OV-3 ne présentent aucun marquage avec cet anticorps. Les lignées de sélection et de contre-sélection ont ainsi été validées.



**Figure 26 :** Immunomarquage des cellules de sélection NIH:OVCAR3 et de contre-sélection SK-OV-3 par l'anticorps anti-Mucine16 Vk8. *Le marquage par l'anticorps Vk-8 sur les cellules cultivées en 2D est révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa488.*

### 3.2 Création d'une lignée cellulaire NIH:OVCAR3 Down Mucine16 (Muc16Sh-GFP)

La réussite de ce Cell-SELEX et l'obtention d'aptamères spécifiques des cellules NIH:OVCAR3 ne permet pas d'affirmer la liaison à la protéine Mucine16. En effet, cette spécificité signifierait que ces aptamères sont capables de reconnaître une molécule à la fois présente sur les cellules de sélection et absente de la surface des cellules de contre-sélection (SK-OV-3). Ce qui peut être le cas d'une multitude de molécules.

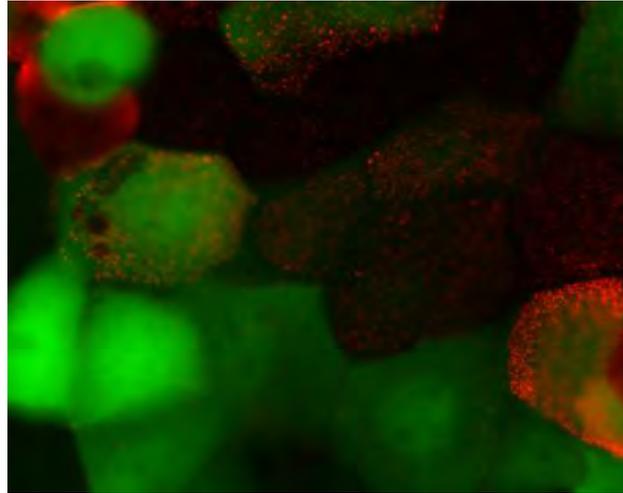
Pour valider la reconnaissance spécifique des aptamères sélectionnés envers la Mucine16, nous avons donc établi la lignée NIH:OVCAR3 DownMuc16 qui exprime de façon stable un shRNA dirigé contre la Mucine16. Des aptamères capables de se lier aux cellules NIH:OVCAR3 et pas ou peu aux mêmes cellules DownMuc16 cibleraient nécessairement la Mucine16 ou une protéine associée dont la présence est conditionnée par la Mucine16. Dans les deux cas, les aptamères seraient susceptibles d'être utilisés pour marquer ou cibler les cellules épithéliales cancéreuses ovariennes surexprimant la Mucine16.

Une lignée cellulaire NIH:OVCAR3 KnockDown Muc16 ont été réalisées par l'équipe de Docteur Piché par la transfection et l'expression du scFv (single-chain Fragment variable) de l'anticorps Vk-8 (Thériault et al. 2011). Cependant nous n'avons pas eu l'autorisation d'utiliser ces cellules. Nous avons donc entrepris de les produire au laboratoire par une approche shRNA. Des cellules épithéliales de la cornée (HCLE) knockdown Muc16 ont été précédemment produites par l'approche shRNA dans le laboratoire d'Irene K. Gipson (Blalock et al. 2007). Nous avons repris les séquences de ces shRNA et les avons transfectées par le biais d'un vecteur lentiviral dans les cellules NIH:OVCAR3.

Trois vecteurs lentiviraux servant à l'expression de trois différents shRNA anti-Mucine16 ont été préparés. Chacun d'eux contient une cassette d'expression constitutive de la GFP afin d'identifier les cellules efficacement infectées.

### 3.2.1 *Contrôle du taux d'expression*

Après infection, le taux d'extinction de la Mucine16 a été observé par immunomarquage avec l'anticorps Vk-8 et par observation de l'expression du gène rapporteur GFP. Les premières acquisitions ont mis en évidence une hétérogénéité de l'expression du gène rapporteur GFP et de la Mucine16 au sein de la population cellulaire NIH:OVCAR3 Muc16Sh infectée (**Figure 27**).



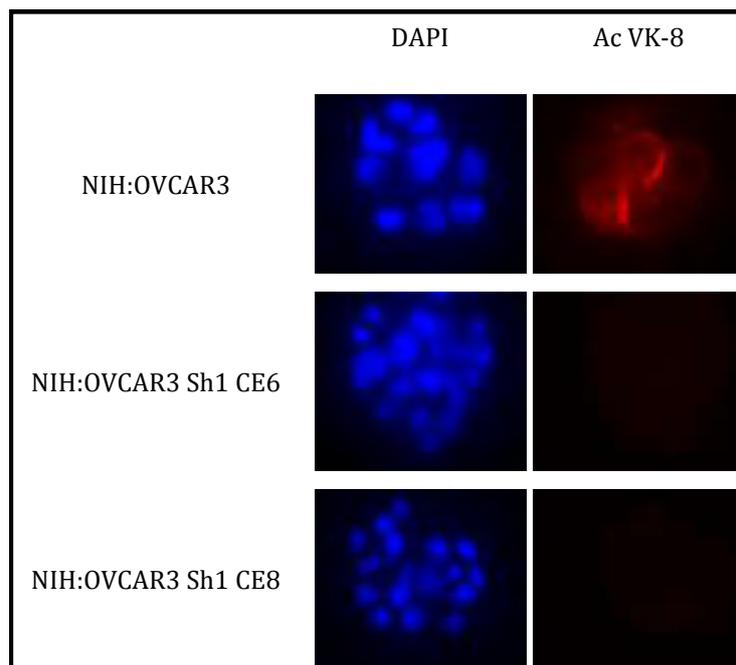
**Figure 27 :** Marquage immunofluorescent de la Mucine16 sur les cellules NIH:OVCAR3 infectées. L'anticorps Vk-8 est révélé par l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa555. Les cellules exprimant le vecteur lentiviral sont vertes dû à l'expression de la GFP.

L'intensité de fluorescence de la GFP et donc son efficacité d'expression semble corrélée à l'intensité de l'immunomarquage par Vk-8. Les cellules qui expriment fortement la GFP ne sont pas marquées par l'anticorps anti-Mucine16, démontrant la quasi extinction de l'expression membranaire de cette protéine sur les cellules GFP positives.

### 3.2.2 *Dilution limite*

Notre intérêt est de créer une population de cellules homogène quant à l'extinction de la Mucine16. Afin de ne conserver que les cellules dont le taux d'extinction est élevé, nous avons effectué un tri des cellules GFP par FACS puis une dilution limite de ces cellules sur plaque 96 puits à raison de 1 cellule par puits au maximum.

Parmi les clones ainsi créés, ceux dont l'expression de la GFP était la plus forte ont été conservés. L'extinction de l'expression de la Mucine16 a enfin été testée par immunofluorescence avec l'anticorps Vk-8 (**Figure 28**). Les deux populations clonales infectées par la construction shRNA présentées ne montrent aucun marquage visible par l'anticorps Vk-8. La diminution de l'expression de la Mucine16 est importante dans les lignées clonales NIH:OVCAR3 Sh1 CE6 et NIH:OVCAR3 Sh1 CE8.



**Figure 28 : Contrôle de l'expression de la Mucine16 par immunofluorescence sur les clones shRNA.** La coloration DAPI permet de visualiser les noyaux cellulaires et donc détecter la présence des cellules. Le marquage par l'anticorps Vk-8 anti-Mucine16 révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa555 permet de rendre compte de la présence de la protéine à la surface des cellules.

### 3.2.3 Utilisations des cellules NIH:OVCAR3 Down Muc16

Les shRNAs choisis sont décrits comme ayant un taux d'extinction de l'ordre de 90% à 95% sur les cellules épithéliales de la cornée. Les lignées NIH:OVCAR3 Muc16Sh-GFP créées ne peuvent donc pas être utilisées pour la contre-sélection lors du Cell-SELEX, la présence résiduelle de la Mucine16 sur les cellules de contre-sélection conduirait à la perte des séquences les plus affines.

Ces lignées cellulaires vont donc servir lors de la détermination de la spécificité des aptamères sélectionnés pour la protéine Mucine16. Si les aptamères sont

spécifiques de cette protéine, nous devrions voir une forte différence de capacité de liaison des aptamères entre les deux lignées NIH:OVCAR3 native et NIH:OVCAR3 Muc16Sh-GFP.

### 3.3 Sélection

Le Cell-SELEX a été pratiqué selon le protocole développé au sein de l'équipe de Weihong Tan. La sélection s'est faite sur cellules vivantes et adhérentes en flasque de culture. Des contre-sélections ont été opérées sur la lignée cellulaire SK-OV-3 lors de certains cycles de SELEX avant l'incubation des séquences avec les cellules NIH:OVCAR3. Ce sont donc les séquences non retenues sur SK-OV-3 qui sont mises en interaction avec NIH:OVCAR3.

#### 3.3.1 *La librairie :*

La librairie 5 utilisée a été construite au laboratoire afin de répondre à un certain nombre de critères :

- Une partie dégénérée de 25 nucléotides de long pour une diversité de  $10^{15}$  molécules, soit 6 représentants de chaque séquence dans les 10 nanomoles ( $6 \cdot 10^{15}$  molécules) utilisées pour la première interaction. Ainsi, nous pensons explorer un maximum de la diversité de la banque.
- Pas de complémentarité et donc pas de structuration entre les 2 extrémités fixes.
- Pas d'hybridation possible entre une extrémité et la séquence complémentaire de l'autre (pour limiter la création d'amplicons non-souhaités en PCR).
- Pas de préstructuration par complémentarité ou G-quartet au sein de chaque extrémité fixe.
- Des températures d'hybridations d'environ  $65^{\circ}\text{C}$  pour chaque extrémité fixe et sa séquence complémentaire.

Les températures d'hybridation en PCR ont été testées pour cette librairie sur une gamme allant de 54 à 64°C. La température d'hybridation choisie est de 63°C, elle permet un bon rendement d'amplification sans entraîner l'apparition rapide de produits de taille non souhaitée.

### 3.3.2 *Purification des ADNsb sur colonne streptavidine :*

Afin de gagner du temps sur la réalisation des SELEX et de s'affranchir de la purification sur gel de polyacrylamide, nous avons opté pour la génération de produits PCR à partir d'amorces « anti-sens » biotinylées et la purification de l'ADNsb « sens » par déshybridation alcaline sur colonne streptavidine.

Cette méthode n'ayant jamais été utilisée auparavant au laboratoire, nous avons cherché à déterminer la nature des produits purifiés et de calculer le rendement de purification.

Nous avons d'abord réalisé une PCR à partir d'une librairie marquée en 5' à la fluorescéine en utilisant une amorce « sens » 5' fluorescéine et une amorce « anti-sens » 5' biotinylée (35 tubes de 50 µL avec un total de 850 pmoles de chaque amorce). Les produits PCR sont mis à incuber avec une quantité de billes permettant de fixer 5 nmoles de biotine sur roue-tournante durant 1 heure. Puis la solution est déposée dans une colonne vide, la fraction non-retenue est récupérée, deux lavages sont effectués puis une solution de soude 0,2 M est déposée et laissée à incuber 5 minutes dans la colonne afin de déshybrider les brins « sens ». La solution d'élution sodique est récupérée et immédiatement tamponnée à pH neutre. Deux éluions supplémentaires sont effectuées. Les échantillons sont enfin déposés sur gel de polyacrylamide natif (**Figure 29A**) afin de déterminer la nature des séquences contenues dans chaque fraction (ADNdb ou ADNsb).

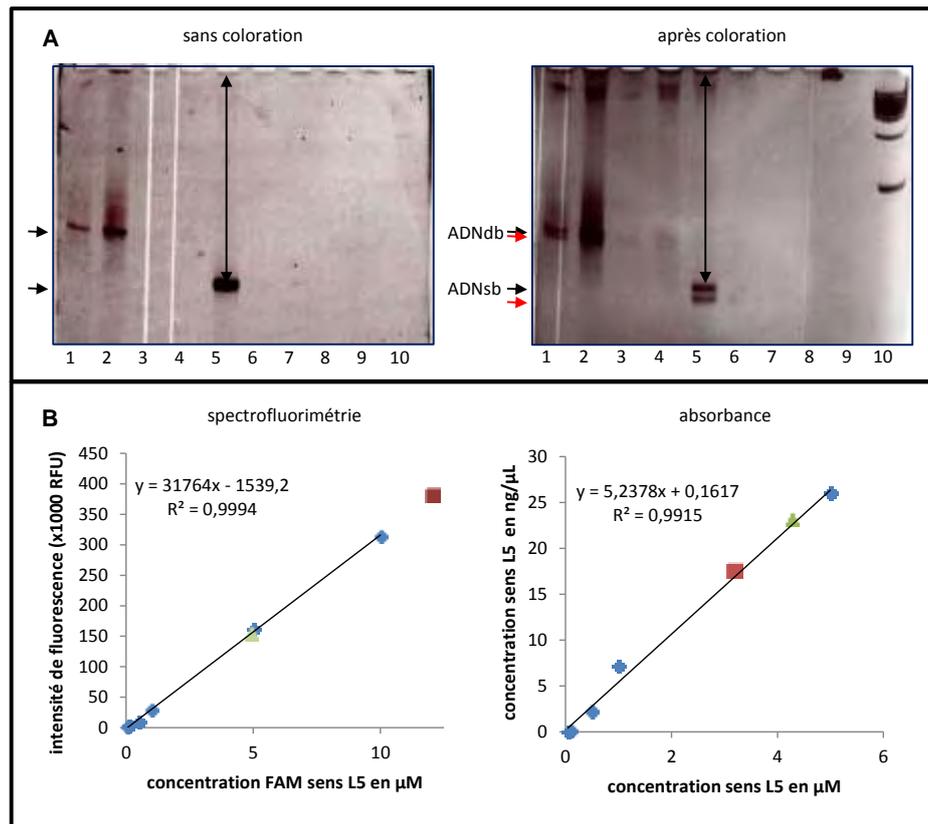
Le gel est d'abord observé sans coloration par un agent intercalant afin d'observer le marquage fluorescéine. Les produits PCR déposés (pistes 1 et 2) nous permettent de déterminer la migration de l'ADNdb. Nous n'observons pas d'ADNsb ou ADNdb marqué à la fluorescéine dans la fraction non-retenue (piste 3) ce qui signifie qu'une très grande majorité des séquences ADNdb ont été efficacement fixées à la colonne. Le premier lavage (piste 4) n'entraîne pas le décrochage de

séquences simple ou double-brin. Enfin, la première élution (piste 5) contient des séquences d'ADNsb marquées fluorescéine (ADNsb « sens »). Les 2 éluions suivantes (pistes 6 et 7) ne permettent pas de récupérer d'ADNsb « sens ». Une seule étape d'élution suffit à récupérer la quasi-totalité des séquences ADNsb « sens ».

Après coloration par un agent intercalant, nous observons la très faible présence d'ADNdb dans les fractions non-retenue (3) et de lavage (4). Une seconde bande migrant légèrement plus vite que le produit marqué à la fluorescéine est observée ( → ) que ce soit pour l'ADNdb (1 et 2) ou l'ADNsb (5). Cette bande correspond à des produits PCR et des ADNsb « sens » ayant été générés à partir d'amorces « sens » non marquées à la fluorescéine. Ceci démontre que l'efficacité de marquage des oligonucléotides n'est pas de 100%.

Nous étant assuré de la nature ADNsb « sens » des produits élués, nous avons cherché à déterminer le rendement de purification par mesure des intensités de fluorescence émise par la fluorescéine et par mesure des absorbances des bases azotées (**Figure 29B**). Nous avons construit des courbes étalons en utilisant une gamme de concentration d'amorce « sens » marquée 5'-fluorescéine ( ◆ ). Les intensités de fluorescence et l'absorbance du produit PCR ( ■ ) et de l'éluat d'ADNsb ( ▲ ) dilués 10 fois sont mesurées. Les résultats d'absorbance ne sont pas directement interprétables puisque le nombre de bases azotées de chacun des composés considérés est différent. Il faut appliquer un facteur correcteur correspondant au rapport entre les nombres de bases de l'ADNdb ou de l'ADNsb et l'amorce « sens ».

Les calculs effectués à partir des deux types de mesure donnent des résultats similaires avec une quantité totale de produit PCR de 700 pmoles avant purification et 250 pmoles d'ADNsb « sens » élué. Soit un rendement de purification de 35%. Ce rendement correspond à ce qui a ensuite pu être décrit dans la littérature avec un rendement de 50% sans précipitation éthanolique (Svobodová et al. 2012). Sachant que la précipitation éthanolique d'ADNsb conduit à la perte d'environ 30% des produits, nos résultats sont tout à fait en accord avec la publication.



**Figure 29 : Rendement de purification d'ADNsbs sur colonne de streptavidine.** Nous avons déposé sur gel de polyacrylamide natif (A) des échantillons correspondants au produit PCR (pistes 1 et 2), à la fraction non-retenue (3), au premier lavage (4) et aux 3 éluions d'ADNsbs successives (5, 6 et 7) pour déterminer la nature des séquences. Des quantifications ont été effectuées par dosage spectrofluorimétrique et d'absorbance sur un précipitat de produits PCR (■) et l'éluat (▲) (B).

### 3.3.3 Conditions de stringence utilisées en SELEX

Afin de sélectionner les aptamères les plus affins pour les cellules NIH:OVCAR3, nous avons fait évoluer les conditions de stringence tout au long des 20 cycles de Cell-SELEX (Figure 30). Ainsi, nous avons réduit la quantité de cible par la diminution du nombre de cellules en présence lors de l'interaction en jouant à la fois sur le taux de confluence et sur la taille des flasques. Nous avons également doublé les durées d'interaction et de lavages à partir du cycle 9.

A partir du cycle 13, la taille des flasques a été divisée par 3 lors de la sélection sur les cellules NIH:OVCAR3. La réduction du nombre de cellules, alors

que les volumes opérationnels d'interaction et de lavage sont conservés, permet de réduire la concentration en cible (Mucine16) et donc augmente la compétition pour la liaison. Dans un même temps, le nombre de cellules pour la contre-sélection a été conservé de manière à augmenter l'efficacité de cette étape. Une méthode couramment utilisée pour augmenter la sélection d'aptamères affins est de réduire le nombre de séquences en présence. Nous n'avons pas utilisé ce procédé. La réduction à 200 pmoles à partir du cycle 2 est le fait de la grande difficulté de générer plus d'ADNsb purifié après PCR. Lors des 3 derniers cycles, la quantité de séquences est inférieure à 200 pmoles de par la présence de séquences de taille plus grande qui conduisent à une surestimation du nombre de molécules comme détaillé en section II-3.3.4.4. La température à laquelle s'effectue la sélection a été diminuée de 20°C à 4°C pour diminuer la possibilité de conserver des séquences non-spécifiques par phénomène d'endocytose passive.

n° cycle SELEX	Sélection NIH:OVCA3	Contre-sélection SK-OV-3	Quantité de Séquence	Température de sélection	Temps (en minutes) interaction/Lav1/Lav2	Volume (en mL) interaction/Lav1/Lav2
1	flasque 75cm <sup>2</sup>		10nmol	20°C	30/15/5	5/5/1
2			200pmol			
3		flasque 75cm <sup>2</sup>				
4						
5						
6		flasque 75cm <sup>2</sup>				
7						
8						
9		flasque 75cm <sup>2</sup>				
10						
11						
12		flasque 75cm <sup>2</sup>				
13	flasque 25cm <sup>2</sup>			<200pmol	4°C	60/30/10
14						
15		flasque 75cm <sup>2</sup>				
16		flasque 25cm <sup>2</sup>				
17						
18		flasque 75cm <sup>2</sup>				
19						
20						

**Figure 30 : Conditions de stringence du Cell-SELEX.** Les conditions d'interaction, de lavage (Lav1/Lav2) et les volumes d'éluion ont été modifiées au cours du SELEX.

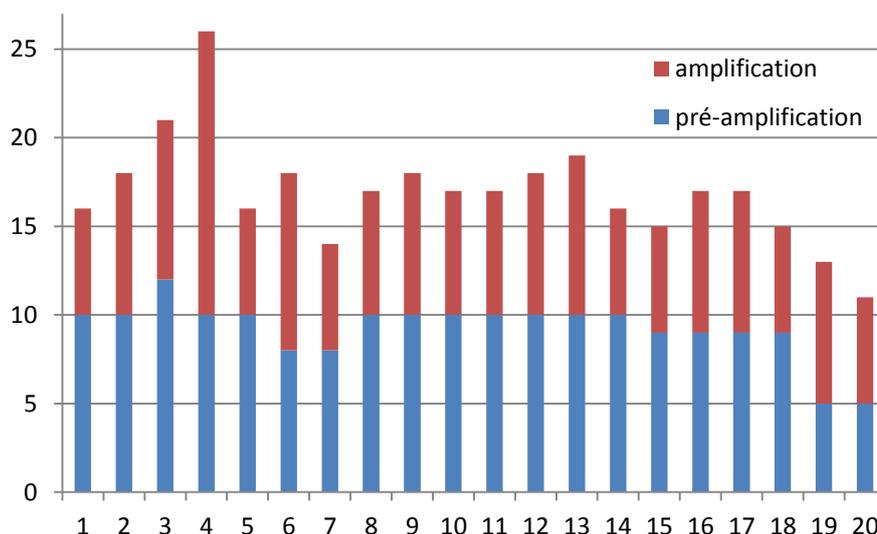
### 3.3.4 Suivi du Cell-SELEX :

Au cours d'un Cell-SELEX, il est compliqué de déterminer si l'enrichissement est effectif au cours du processus. Des techniques ont été développées afin d'avoir

un aperçu de l'enrichissement en séquences affines (section Introduction-8) telles que des mesures d'affinité moyenne de la sous-librairie de séquences par FACS dans le cas de Cell-SELEX mais cela nécessite un travail de mise au point et l'obtention de séquences ADNsb de chaque sous-librairie en grande quantité. Il est également possible d'observer l'enrichissement en séquences de manière indirecte par l'observation de la diminution de la diversité des sous-librairies au cours du SELEX (section Introduction-8). Enfin, la quantification des séquences éluées de la cible à chaque cycle et la comparaison qui s'en suit entre permet de déterminer si l'affinité moyenne de la sous-librairie va en augmentant ou en diminuant.

#### 3.3.4.1 Nombre de cycles de PCR

La comparaison du nombre de cycles de PCR en cascade (section III-5) nécessaire à l'obtention de la quantité souhaitée de produits double-brin entre chaque cycle de sélection permet de se rendre compte de l'évolution de la quantité d'ADN élué des cellules à chaque cycle (**Figure 31**). Plus le nombre de séquences éluées sera élevée, plus il y aura de brins matrice en début de PCR et plus vite l'on obtiendra la quantité souhaitée d'ADNdb.

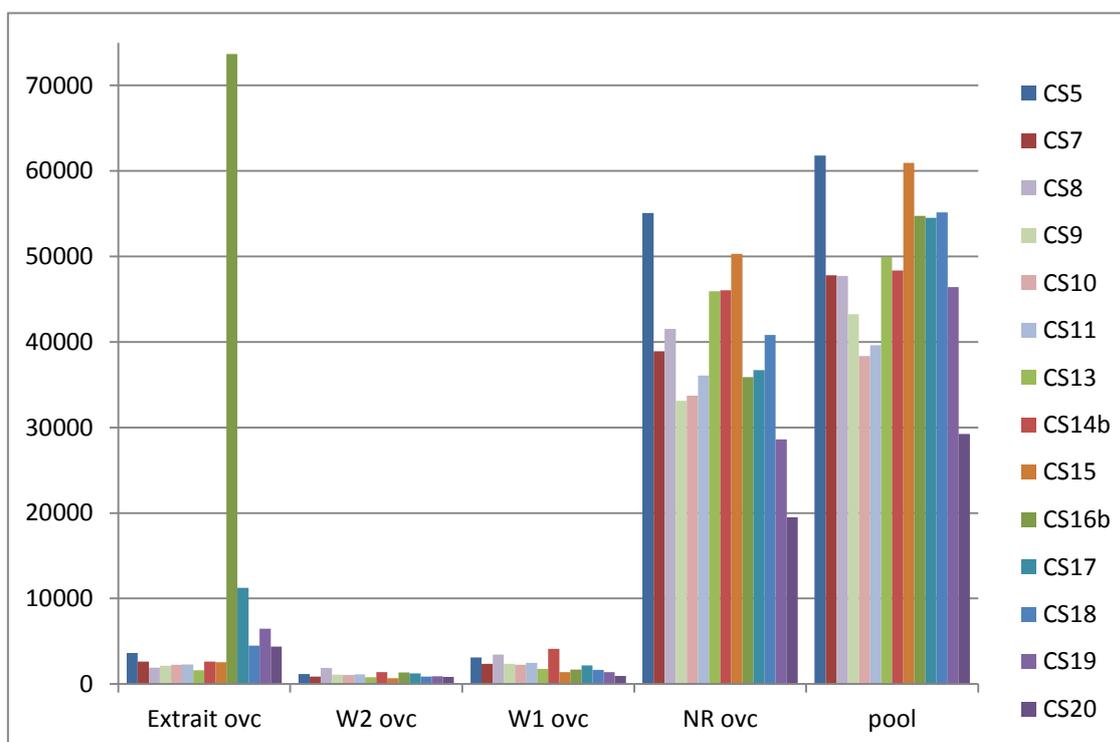


**Figure 31 : Evolution du nombre de cycles de PCR en cascade au cours du Cell-SELEX.** Le nombre de cycles de pré-amplification et d'amplification nécessaire à la production d'environ 700 pmoles d'ADNdb est représenté en fonction du cycle de Cell-SELEX considéré.

On observe que le nombre de cycles de PCR nécessaires lors de la PCR en cascade est peu variable entre les cycles 5 et 17, la quantité de séquences en début de PCR semble quasiment la même alors que dans un même temps la stringence a été augmentée (**Figure 30**). On observe une diminution du nombre de cycles de PCR nécessaires à l'amplification des 700 pmoles d'ADNdb à partir du cycle 17.

### 3.3.4.2 Quantité de séquences éluées

Les séquences d'ADNsb utilisées lors du SELEX étant marquées 5'-fluorescéine, nous avons procédé à des mesures de fluorescence de toutes les fractions obtenues lors de la mise en interaction avec la cible (**Figure 32**).



**Figure 32 : Dosage spectrofluorimétrique des fractions de Cell-SELEX.** Les solutions de liaison avant interaction (*pool*), les fractions non retenues (*NR*), les lavages (*W1* et *W2*) ainsi que l'extrait ont été exposés à des mesures de fluorescence à 515 nm de la fluorescéine couplée aux séquences ADNsb. La plupart des 20 cycles de Cell-SELEX sont représentés (CS5 à CS20).

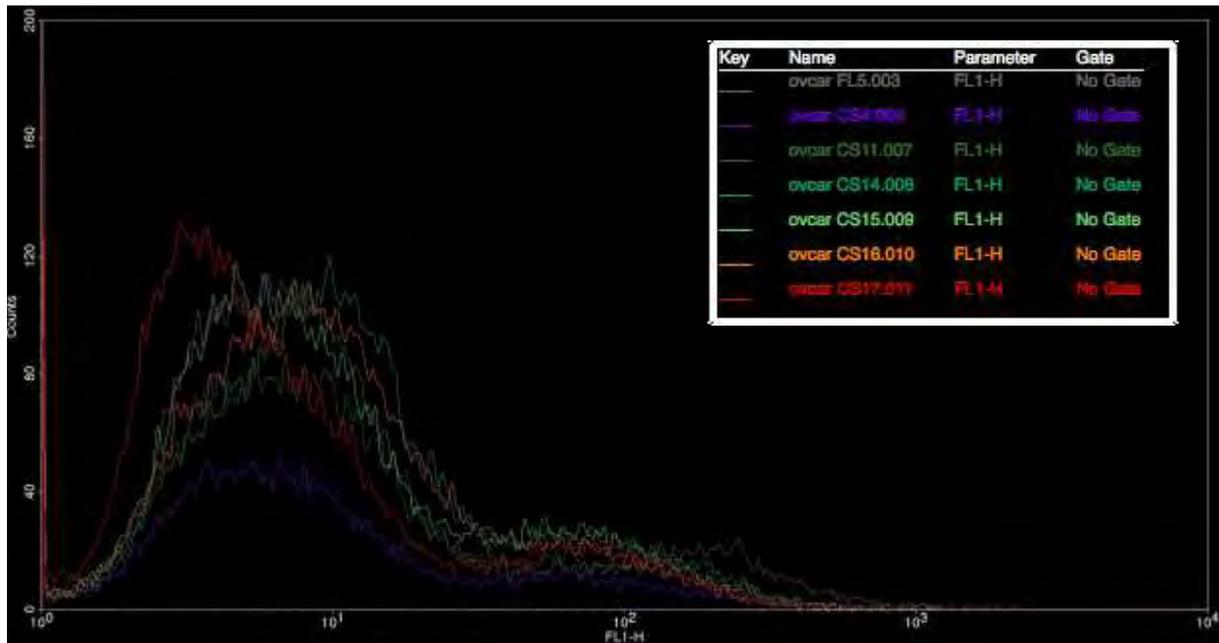
Nous avons pu observer une augmentation de la proportion de séquences liant les cellules NIH:OVCAR3 au cours des cycles. La diminution croissante de la

fluorescence observée dans les pools à partir du cycle 17 s'explique par l'apparition de la bande haute correspondant à des séquences à deux parties dégénérées. En effet, le dosage de l'ADNsb pour la mise en interaction a été faite par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm. Etant donnée la longueur accrue de ces séquences, la mesure d'absorbance conduit à une surévaluation de la quantité d'ADNsb vis-à-vis de la quantité de fluorochrome et donc de molécules. Nous avons donc moins de 200 pmoles d'ADNsb lors de la mise en interaction sur les cellules lors des derniers cycles de SELEX.

La très forte fluorescence mesurée dans l'extrait du cycle 16 par rapport aux autres cycles ne trouve pas d'explication logique d'un point de vue expérimental. La purification d'ADNsb à l'issue du cycle 15 ayant permis d'obtenir plus de 400 pmoles de sous-librairie, nous avons pu procéder à un second cycle 16 qui a donné des résultats similaires avec une quantité de fluorescence très accrue dans les extraits cellulaires.

#### 3.3.4.3 Suivi de l'enrichissement en FACS

Afin de voir de manière plus directe l'évolution de l'affinité des séquences sélectionnées pour les cellules NIH:OVCAR3 au cours du SELEX, nous avons entrepris de déterminer la capacité des pools obtenus à pouvoir se lier aux cellules. Nos séquences étant marquées à la Fluorescéine en 5', nous avons utilisé le surplus d'ADNsb purifié aux cycles 4, 11, 14, 15, 16 et 17 (CS4 à CS17) pour une expérience en cytométrie de flux (**Figure 33**). La librairie naïve FL5 (Fluoresceine-Librairie5) a été utilisée comme contrôle. Les résultats présentés ci-après montrent un léger marquage de la principale population de cellules pour les séquences issues des cycles 14 et 15. Cependant, la validité de ces résultats et la présence d'une population entre les valeurs de fluorescence 12 à 300 seront discutés dans la section II-**3.7.2** concernant la mise au point de marquage par des aptamères nucléiques en FACS.



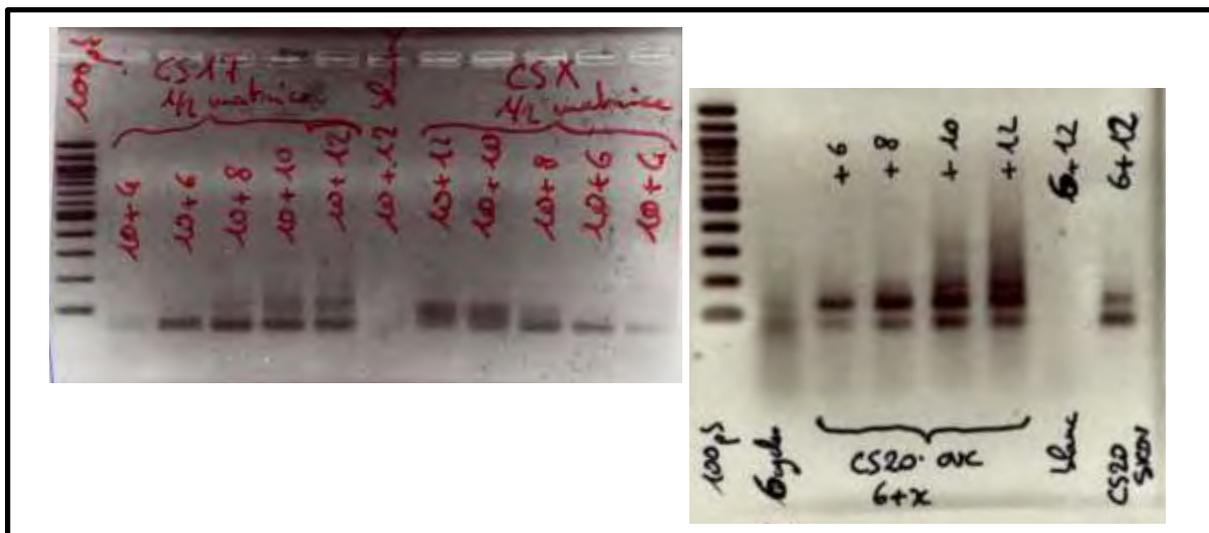
**Figure 33 :** Suivi de l'évolution de l'affinité moyenne des sous-librairies pour les cellules NIH:OVCAR3. La librairie naïve (FL5) et les sous-librairies des cycles 4-11-14-15-16 et 17 ont été incubées 10 minutes avec 500 000 cellules NIH:OVCAR3 à une concentration de 250 nM.

#### 3.3.4.4 Arrêt du SELEX

Le Cell-SELEX contre les cellules NIH:OVCAR3 a été stoppé après 20 cycles. A partir du cycle 17, une bande discrète correspondant à environ deux fois la taille des séquences originelles de la banque est apparue (**Figure 34**). Le profil observé sur gel d'agarose est différent de celui obtenu lors de la suramplification d'une librairie naïve comme illustré sur les pistes du cycle contrôle en l'absence de cellules (**CSX**). La suramplification de la librairie naïve entraîne l'apparition d'un smear de séquences de tailles supérieures à la taille souhaitée. La bande « haute » générée à partir du cycle 17 est discrète (**CS17 10+12**). La proportion de la bande « haute » augmente entre les cycles 17 et 20 par rapport aux séquences de même taille que la librairie. Au cycle 20, nous amplifions plus de matériel de la bande « haute » que de matériel à la taille souhaitée. Le dépôt sur gel des produits ADNsb purifiés à partir du cycle 17 démontre la présence de la bande « haute » fluorescente (données non montrées), ceci indique qu'au moins un des brins de cette bande « haute » n'est pas biotinylé et est généré à partir de l'amorce 5'-Fluorescéine. La méthode de purification de l'ADNsb que nous utilisons ne permet pas de purifier sélectivement les séquences de la taille souhaitée et d'éliminer la bande « haute ». Il aurait donc fallu

## Sélection d'Aptamères Ciblant la Mucine16

plus de volume de PCR pour générer les 700 pmoles d'ADNdb de taille souhaitée et procéder à une étape supplémentaire de purification sur gel qui aurait diminué le rendement. Nous avons donc choisi d'arrêter le processus de sélection pour passer à la phase de caractérisation et d'analyse des séquences sélectionnées. On constate que l'amplification des séquences contre-sélectionnées sur les cellules SK-OV-3 voit une proportion beaucoup plus faible de séquences « hautes » par rapport aux séquences sélectionnées sur les NIH:OVCAR3 d'un même cycle (**CS20**), ceci a été également observé pour les sous-librairies sélectionnées et contre-sélectionnées pour les cycles 17, 18 et 19. Pris ensemble, ces résultats quant à l'enrichissement sur ces 4 derniers cycles de séquences « hautes » sur les cellules NIH:OVCAR3 et leur plus faible proportion sur les cellules SK-OV-3 mènent à penser que ces séquences « hautes » sont spécifiquement sélectionnés et enrichies sur les cellules NIH:OVCAR3. On remarque également que la suramplification des sous-librairies contenant cette bande « haute » conduit à la génération de produits de taille supérieure et qui semble des multiples de la bande de taille attendue.



**Figure 34 :** Apparition d'une bande « haute » à partir du cycle 17. Les profils d'amplification des sous-librairies issues des cycles 17 et 20 de Cell-SELEX (CS17 et CS20) et d'un cycle contrôle sans cellules (CSX) sont comparés.

### 3.4 Clonage

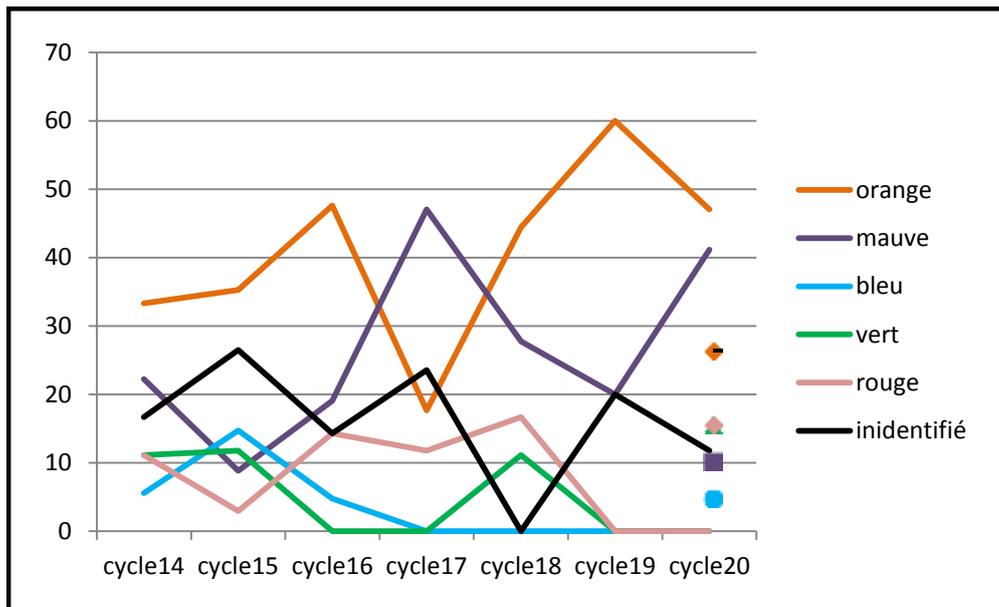
Nous avons cloné puis séquencé les séquences sélectionnées des cycles 14 à 20 et les séquences contre-sélectionnées lors du cycle 20 d'après la méthodologie décrite section Méthodologie-6.1(**Figure 16**).

Une analyse par alignement multiple de séquences par le programme Clustal Omega a permis de mettre en évidence des motifs partagés par plusieurs séquences clonées. Nous avons ainsi pu identifier 8 motifs auxquels ont été attribués des couleurs (mauve, orange, rose, vert, bleu, azur, dragée et or). Le nombre de séquences contenant chaque motif est très variable sur les cycles considérés, allant de 3 à 64 séquences pour les motifs dragée et orange respectivement (**Figure 35**). De même, on observe que certains motifs sont très variables (le vert par exemple) et sont partagés par un grand nombre de séquences différentes alors que le motif mauve qui est fortement représenté n'est composé que de deux séquences variant seulement d'une base. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'évolution de ces motifs au cours des derniers cycles de SELEX (**Figure 36**).

Sélection d'Aptamères Ciblant la Mucine16

14_15	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	16_03	-----GGAAGCAAGTTTAAAC-CACAATGCTG-----
14_07	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	15_02	-----GAACCAAGTCTACCAAAATGCTG-----
15_34	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	16_22	-----GTAATCAAGTTCCGC-CAAAACACTG-----
15_32	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	14_04	-----GTAAAGCAAGTTCTCC-CATATCGCTG-----
15_24	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	15_11	-----GTAAAGCAAGTTTACC-TAAATCACTG-----
15_17	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	16_01	-----GGAAACCAAGTCTAAC-CCAAATACTG-----
15_13	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	14_18	-----GTAAACATAGTCTACC-ACTAACGCTG-----
15_9	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	208K_20	-----GGAAGCAAGTTTACC--CCATCGCTG-----
16_21	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	19_20	-----CCTGAGCCAAATGATG-GCTAGGCGC-----
16_16	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	17_11	-----CCTGAGCCAAATGATG-GCTAGGCGC-----
16_09	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	19_18	-----GCGAAATGCTCTGAAACTCGTTTTG-----
17_03	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	19_19	-----GCGAAATGCTCTGAAACTCGTTTTG-----
18_13	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	17_06	-----GCGAAATGCTCTGAAACTCGTTTTG-----
18_06	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	20_01	-----ATCACAAAACACTTACATCAATCGCCTC-----
19_17	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	17_07	-----ATCACAAAACACTTACATCAATCGCCTC-----
19_13	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	19_06	-----ACAAACCACTACTTCTACTCTTCTC-----
19_08	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	208K_04	-----CACAAATTACAAGCTCT-CTATATGG-----
19_01	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	16_11	-----CCATCTCATATTTACTGCTCTAGTG-----
208K_15	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	208K_01	-----GTAATGTATTAGCCCT-ATCATCCCC-----
208K_14	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	16_18	-----GTAATGTATTAGCCCT-ATCATCCCC-----
20_02	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	15_17	-----CAAACCTGTATTAAACCT-CTCACTCC-----
20_14	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	15_18	-----GTACAGTATTAAACCT-ATGCTAGC-----
20_07	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	15_23	-----GGTACTGTATTAAACCTTATGACGC-----
20_02	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	14_06	-----GGCAGTGTATTAAACCTACTTACTG-----
19_05	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	15_27	-----GGACAGTATAAACCT-ATTACCAACC-----
20_10	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	15_20	-----CAATCCCTGTATAAACCT-ATTTC-----
19_02	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	208K_10	-----CATAAAAAGTGTATCACCTGT-ACGC-----
19_03	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	18_09	-----CATAAAAAGTGTATCACCTGT-ACGC-----
19_07	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	18_10	-----CATAAAAAGTGTATCACCTGT-ACGC-----
18_02	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	15_03	CAAAACAATTAACCGCTCTGATCCCAATCTACCATTC-----
18_08	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	15_04	CAAAACAATTAACCGCTCTGATCCCAATCTACCATTC-----
18_12	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	15_19	-----GCCATTTCCGCTCCACTCTCTCTCC-----
18_03	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	208K_06	-----GCCACATTTTCT-CTCTCTCTAC-----
17_04	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	208K_07	-----CACATTT-CT-CTCTTTTACATTTTTTC-----
16_07	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	208K_12	-----CACACTCTCT-CTCGCTCATTTTGGC-----
16_14	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	14_13	-----GCCACTCTCTCTCTCTCTCATCTAC-----
15_10	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	15_26	-----ACCAGCTCTCTCTCTTTTCCACTC-----
15_16	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	14_01	-----CCCTCTCAAGCTCTCACATTTCC-----
15_28	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	15_25	-----CGCAACACCATGACAACTTTTCTC-----
14_03	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	14_12	-----CAAACCTCACATGCGCGACTTTTCTC-----
14_09	-----TAGACTGATGAGACTTTCCCGGATA-----	20_04	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
20_09	-----GAGAAACAGACTGGAGAGACTGTC-----	19_10	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
20_12	-----GAGAAACAGACTGGAGAGACTGTC-----	19_15	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
20_13	-----GAGAAACAGACTGGAGAGACTGTC-----	18_03	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
208K_09	-----GAGAAACAGACTGGAGAGACTGTC-----	17_01	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
208K_13	-----GAGAAACAGACTGGAGAGACTGTC-----	17_05	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
208K_18	-----GAGAAACAGACTGGAGAGACTGTC-----	17_12	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
19_04	-----GAGAAACAGACTGGAGAGACTGTC-----	17_15	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
19_12	-----GAGAAACAGACTGGAGAGACTGTC-----	17_17	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
18_07	-----GAGAAACAGACTGGAGAGACTGTC-----	18_14	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
17_09	-----GAGAAACAGACTGGAGAGACTGTC-----	20_06	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
16_04	-----GAGAAACAGACTGGAGAGACTGTC-----	20_08	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
16_10	-----GAGAAACAGACTGGAGAGACTGTC-----	20_16	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
15_05	-----GAGAAACAGACTGGAGAGACTGTC-----	20_01	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
15_29	-----GAGAAACAGACTGGAGAGACTGTC-----	20_4	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
19_14	-----ACGAAACAGACTGTAGAGACTGTC-----	208K_16	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
15_12	-----ACGAAACAGACTGTAGAGACTGTC-----	208K_17	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
18_04	-----TGCGGACTGCAGAGACCACGCTCCG-----	19_11	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
16_06	-----TGCGGACTGCAGAGACCACGCTCCG-----	19_16	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
16_24	-----TGCGGACTGCAGAGACCACGCTCCG-----	18_05	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
14_10	-----TGCGGACTGCAGAGACCACGCTCCG-----	18_15	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
14_11	-----TGCGGACTGCAGAGACCACGCTCCG-----	18_02	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
19_09	-----GACTGAAGAGTAGTAGGTGGCCGTA-----	17_02	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
16_12	-----GACTGAAGAGTAGTAGGTGGCCGTA-----	17_13	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
208K_02	-----AGACGCTAGTAAACGCTCAGGTGGG-----	17_14	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
208K_05	-----AGACGCTAGTAAACGCTCAGGTGGG-----	16_02	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
208K_19	-----AGACGCTAGTAAACGCTCAGGTGGG-----	16_08	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
16_20	-----AGACGCTAGTAAACGCTCAGGTGGG-----	16_15	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
20_03	-----AGACGCTAGTAAACGCTCAGGTGGG-----	16_17	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
18_01	-----AGACGCTAGTAAACGCTCAGGTGGG-----	15_15	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
17_08	-----AGACGCTAGTAAACGCTCAGGTGGG-----	15_18	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
16_23	-----AGACGCTAGTAAACGCTCAGGTGGG-----	15_22	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
20_11	-----ATACGCTAGTAAACGCTCAGGTGGG-----	14_05	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
18_11	-----ATCCGCTAGCAAAGCGTCAAGTGG-----	14_14	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
18_01	-----ATCCGCTAGCAAAGCGTCAAGTGG-----	14_16	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
17_10	-----ATCCGCTAGCAAAGCGTCAAGTGG-----	14_17	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
15_06	-----TATCCGCTAGCAAAGCGTCAAGTGG-----	20_03	-----AGGTTCCCAACTACTAATGTTGCGC-----
14_08	-----TATCCGCTAGCAAAGCGTCAAGTGG-----	17_16	-----GCGATTAACCACTTGCATT-TGTG-----
16_05	-----TATCCGCTAGTAAACGCTCAGGTGG-----	16_13	-----GCGATTAACCACTTGCATT-TGTG-----
14_02	-----AAGAAGTAACTAGCATAACCGTGT-----	15_01	-----AACCTCTTGCCTCTAATGTTCCG-----
16_19	-----AAAATGAATTAATTAGACAAACC-----	208K_11	-----AGAAGTATAAGATAGTCCGACAGTA-----
208K_03	-----GTAACCAAGCTGTC-CAAATTGCTG-----	15_21	-----ACCTCCACACAAAGACACAC-----
15_30	-----GGAACTAAGTCTGTC-CAG-TTGCTG-----	15_31	-----GCACACTCTATTAACTCACTTACG-----
208K_08	-----GTAACCAAGTATGAC-CGATCTGCTG-----	15_33	-----CACACTCATTTCCCACTACTCTCC-----
15_14	-----GTAACCTAGTATGGC-CAAATTGATG-----	20_05	-----GCACCTCCAAACGAAACACTCGCTCGATAA-----

Figure 35 : Analyse Clustal Omega des séquences du Cell-SELEX clonées. Les séquences clonées à partir des sous-librairies des cycles 14 à 20 sont comparées par Clustal Omega, des motifs sont identifiés et un code couleur leur est attribué.



**Figure 36 :** Evolution de la présence des motifs d'après les données de clonage. Les 5 motifs majoritaires définis par une couleur ont été identifiés parmi les séquences clonées. Leur représentativité en pourcentage de séquences a été calculée et reportée en fonction du cycle de Cell-SELEX. La représentativité des motifs dans la sous-librairie contre-sélectionnée sur les cellules SK-OV-3 au cycle 20 est caractérisée par un symbole.

Outre les séquences représentées dans le Clustal Omega (**Figures 35**), des séquences plus longues ont été clonées correspondant à la bande haute (**Figure 34**). Ces séquences sont toutes composées d'un même enchaînement de régions et possèdent deux parties dégénérées (**Figure 37**). L'analyse de la séquence comprise entre ces deux régions dégénérées permet de formuler une hypothèse pour l'apparition de la bande haute (**Figure 37A**). Si l'on prend le brin « sens » (+) d'une séquence depuis son extrémité 5', on observe d'abord une séquence correspondant à un aptamère complet avec les deux zones d'hybridation des amorces complètes et une partie dégénérée entre elles. Puis une séquence de quelques nucléotides (classiquement 3 à 5) riche en A ( $A_n$ ) suivi des 6 derniers nucléotides de l'amorce « sens » puis de nouveau une séquence dégénérée et l'extrémité 3' de la banque (**Figure 37B**).

Lors de l'amplification PCR des ADNsb extraits de la cible, l'activité terminale transférase de la *Taq* ADN polymérase aboutie au rajout de plusieurs bases en 3' du brin « sens » (majoritairement des adénosines( $A_n$ )). La nouvelle séquence résultante

Sélection d'Aptamères Ciblant la Mucine16

en 3' du brin « sens » (+) est similaire à une partie de la région de la librairie d'amorçage en 5' et est donc capable de s'hybrider avec l'extrémité 3' d'un brin « anti-sens » (-) sur la séquence TTATCC. L'extension par la polymérase lors de la PCR conduit à la formation d'une séquence plus grande comprenant deux régions dégénérées et donnant une bande haute sur gel. La présence de bases guanosine et thymine dans les séquences (A)<sub>n</sub> traduit la diversité d'insertion de l'activité terminale transférase (Figure 37B).

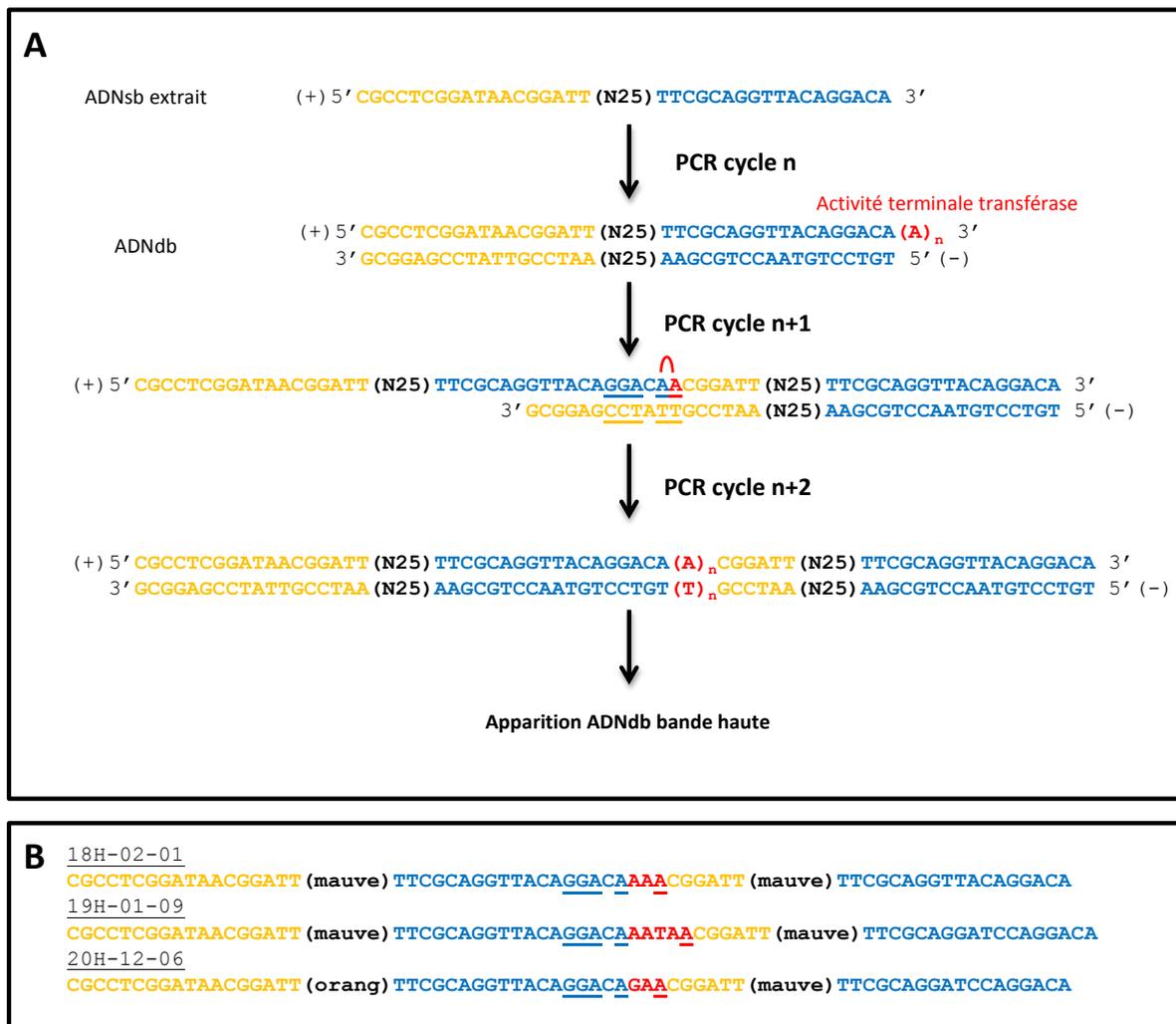


Figure 37 : Hypothèse de génération de la bande haute. Mécanisme proposé pour la génération de la bande haute en PCR (A) et exemples de séquences correspondant à la bande haute clonée (B).

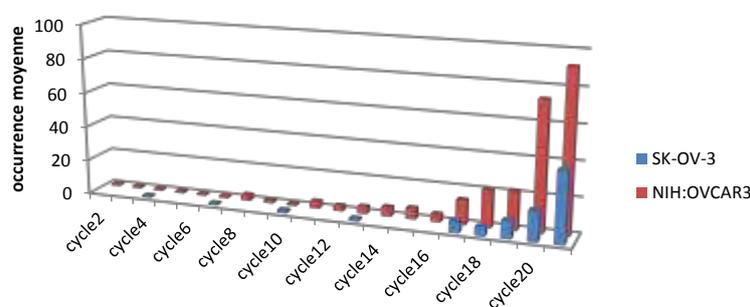
Comme nous l'avons vu dans la section Résultats-3.3.4.4, les séquences longues sont préférentiellement sélectionnées sur les cellules NIH:OVCAR3 à partir du cycle 17. Dans l'hypothèse où chacune des parties dégénérées correspond à des séquences aptamériques capables de se lier à la cible, le Kd de cette séquence

double est augmenté par rapport aux séquences simples entraînant sa sélection préférentielle. En effet, il a été prouvé qu'une construction combinant deux aptamères augmente l'affinité pour la cible par rapport à chaque séquence prise indépendamment (Mahlknecht et al. 2013).

### 3.5 Séquençage haut-débit

#### 3.5.1 Occurrence moyenne des séquences

La première donnée extraite est la diminution de la complexité des sous-librairies au cours du SELEX avec l'émergence de séquences surreprésentées : on observe qu'au cours du Cell-SELEX, l'occurrence moyenne des séquences augmente au cours de l'avancement des cycles, ce qui montre un enrichissement certain (**Figure 38**). La diminution du nombre de cycles de PCR en cascade nécessaire à l'obtention des 700 pmoles d'ADNdb (section Résultats-3.3.4.1) pourrait ainsi s'expliquer par la forte diminution de complexité du cycle 17 et l'enrichissement en quelques séquences surreprésentées.

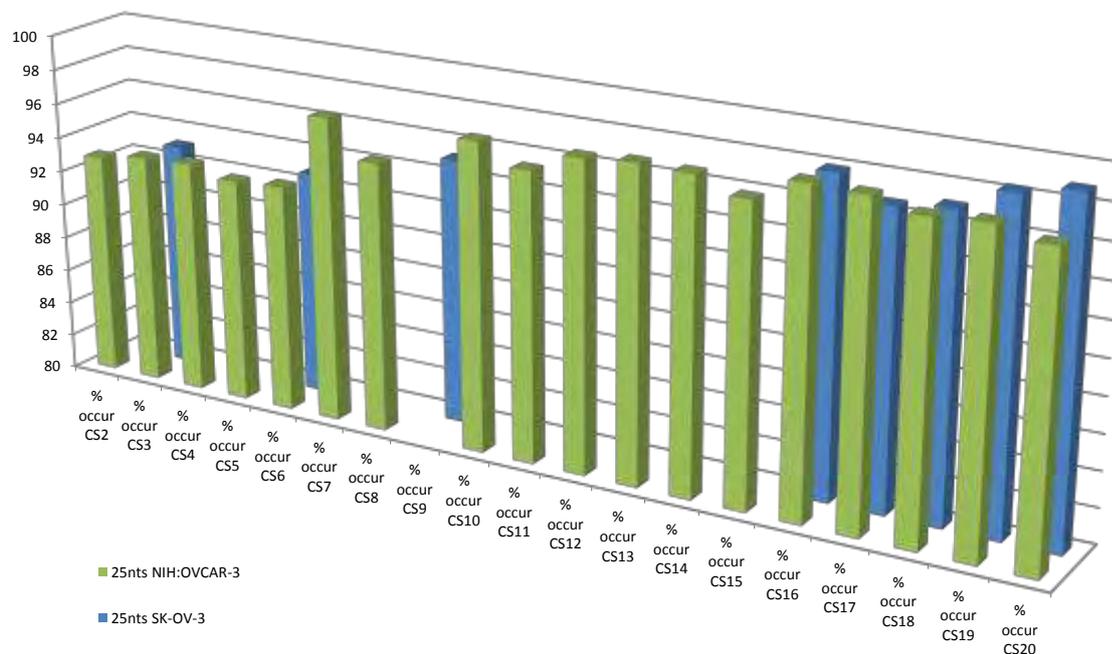


**Figure 38 : Evolution de l'occurrence moyenne des séquences au cours du Cell-SELEX.** Les occurrences moyennes des séquences ont été calculées pour les sous-librairies sélectionnées (rouge) et contre-sélectionnées (bleu).

#### 3.5.2 Taille des régions dégénérées

L'étude de la taille des régions dégénérées montre que les séquences dont la partie dégénérée mesure 25 nucléotides, conformément à la librairie 5, représentent de 92 à 99% des séquences. Toutefois ce traitement a été fait en excluant les séquences de la bande haute qui ont fait l'objet d'une purification et dont la

représentativité au sein des sous-librairies ne peut pas être directement comparée aux autres séquences.



**Figure 39 :** Représentativité des séquences dont la taille de la région dégénérée est égale à 25 nucléotides dans le Cell-SELEX. La proportion des séquences de la taille de la librairie a été déterminée pour chaque sous-librairie de sélection (vert) et de contre-sélection (bleu).

### 3.5.3 Recherche visuelle de motifs

Ce travail effectué, nous avons procédé à une analyse visuelle des séquences possédant les plus grandes occurrences au sein de chaque pool à la recherche de motifs partagés (section Méthodologie-7.1). Les motifs déjà connus à partir des données de clonage sont recherchés en priorité puis de nouveaux motifs dans les séquences restantes sont identifiés. Nous observons à partir du cycle 6 que la plupart des séquences ainsi obtenues possèdent un motif identifiable (**Figure 40**). Nous avons pu compter 9 familles de motifs différentes auxquelles ont été attribué le code couleur (mauve, orange, bleu, vert, rose, dragée, rouge, or et azur). Le motif rouge est le seul qui ne compte pas de représentant dans les données de clonage.



la sous-librairie du cycle 7 qui compte 69 884 séquences, toutes les séquences dont l'occurrence est supérieure à 0,025% de 69 884 (soit une occurrence de 17) ont été analysées visuellement. Pour les sous-librairies des 6 premiers cycles, toutes les séquences représentées plus de 2 fois ont été considérées.

On observe un fort enrichissement dans les occurrences entre les cycles 5 et 7 : la séquence de meilleure occurrence représente 0,034% du total des séquences au cycle 5 contre 0,11% au cycle 6 puis 27,77% au cycle 7.

De manière intéressante, nous observons au cycle 6 deux séquences dont la partie dégénérée ne comprenant que quelques résidus guanosine. Ce type de séquence constitue l'essentiel des séquences obtenus lors de l'analyse des sous-librairies issues du SELEX IL-8. Au cycle 20, on peut observé 4 séquences correspondant à la bande haute.

#### 3.5.4 *Recherche de motifs par MEME*

Ce premier traitement manuel et visuel des séquences ne nous permet pas d'explorer la population de séquences faiblement représentées. Or, l'idée selon laquelle les aptamères les plus affins ne constituent pas forcément les séquences les plus abondantes en termes d'occurrence semble partagée par bon nombre de laboratoires. Aussi, nous avons souhaité explorer la totalité des séquences, y compris celles présentant de faibles occurrences à la recherche de motifs. Nous avons utilisé pour cela les outils d'analyse de motifs MEME suite. Cependant, les temps d'analyse étant très longs lorsque le nombre de séquences à comparer excède les 4 000 entrées, nous avons adopté la stratégie décrite dans la section Méthodologie-[7.2](#) pour réduire la complexité des sous-librairies tout en conservant un maximum de leur diversité.

Les résultats de l'analyse MEME permettent de retrouver les motifs déjà identifiés et n'ont pas permis d'en retrouver de supplémentaires (**Figure 41**). De plus, dans la plupart des sous-librairies, MEME a dissocié en plusieurs motifs les séquences qui d'après l'analyse manuelle appartiennent à un seul et même motif. Enfin, bien que la présence d'un motif soit identifiée par l'analyse visuelle au sein d'une sous-librairie, il arrive que l'outil MEME ne présente pas de consensus associé.

Le motif Mauve est composé d'une faible variété de séquences surreprésentées. Cependant notre approche de traitement des séquences ne permet pas d'obtenir un consensus très discret. Pour traiter la grande quantité de séquences de chaque sous-librairie en respectant le nombre maximal de séquences qui peuvent être traitées par MEME (4 000 séquences), nous avons dû éliminer toutes les séquences présentent qu'une seule fois puis accorder une occurrence de 1 à chaque séquence présente en plusieurs copies (section Méthodologie-7.2). Ceci semble avoir un effet négatif sur la définition de consensus comprenant un faible polymorphisme de séquences. Alors que les séquences M1 et M2 (ne variant que d'une base) représentent à elles seules près de 70% des séquences de la sous-librairie du cycle 19, le consensus issu de MEME tient compte de 195 séquences parmi lesquelles M1 et M2 ne représentent que 2 variants (**Figure 41**).

<u>bleu</u>	<b>CS10</b>	E-value Sites	1.1e-3936 733	
	<b>CS13</b>	E-value Sites	4.9e-3779 765	
	<b>CS14</b>	E-value Sites	2.6e-3363 703	
<u>orange</u>	<b>CS13</b>	E-value Sites	6.2e-880 135	
	<b>CS14</b>	E-value Sites	1.5e-892 144	
<u>vert</u>	<b>CS14</b>	E-value Sites	1.4e-1940 548	
<u>mauve</u>	<b>CS18</b>	E-value Sites	1.5e-1220 220	
	<b>CS19</b>	E-value Sites	1.2e-1144 195	

**Figure 41** : Résultats de recherche de motif par MEME. Quelques exemples de motifs consensus obtenus par MEME sur différents cycles de Cell-SELEX de pour différents motifs sont représentés.

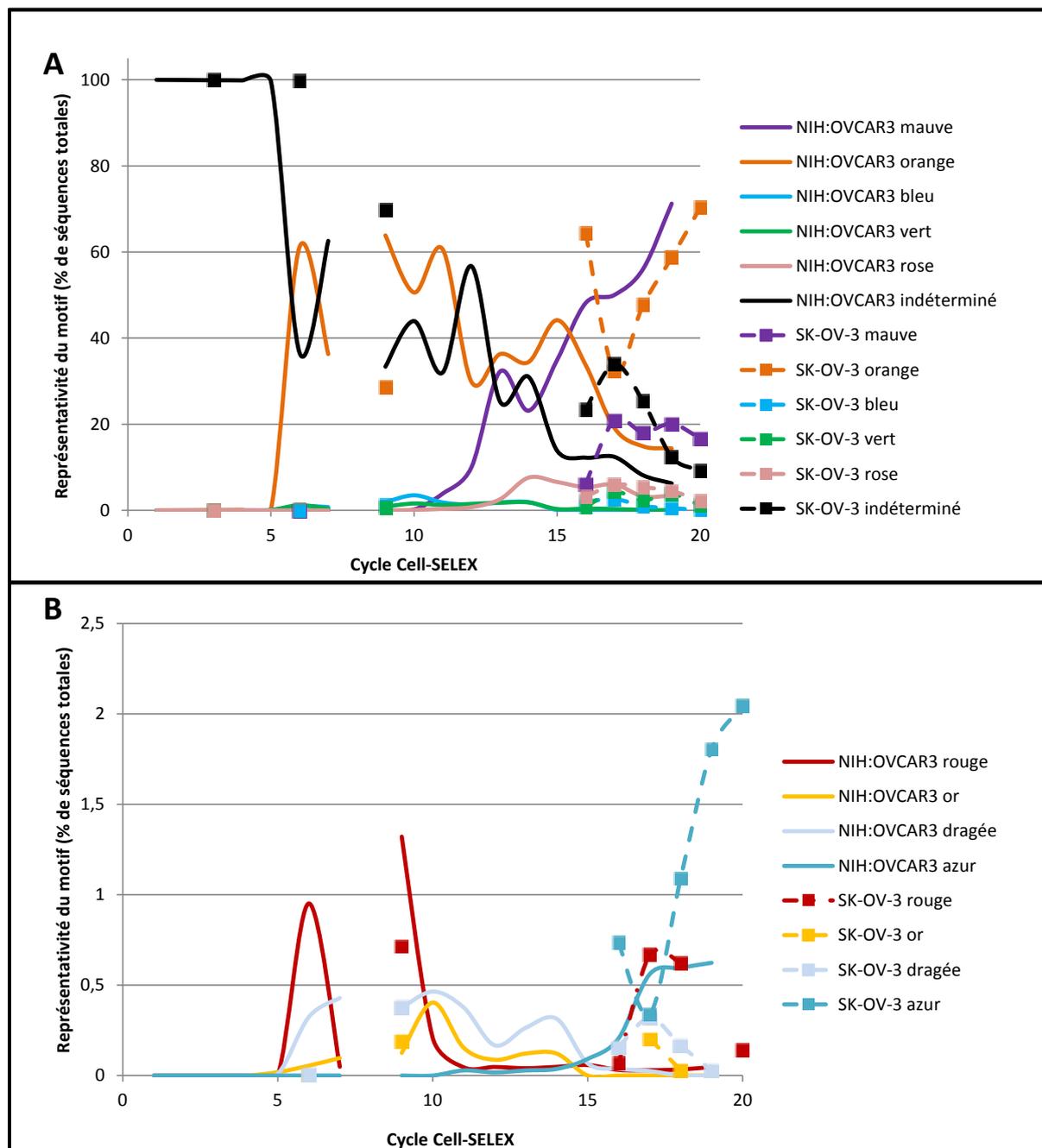
### 3.5.5 *Evolution des populations de motifs*

Nous avons cherché à déterminer les dynamiques d'évolution des motifs au cours du SELEX. La démarche initialement prévue était de se baser sur les motifs identifiés par MEME afin d'effectuer une recherche inverse des séquences correspondant aux consensi par l'outil de recherche MAST. Cependant devant la difficulté à identifier le consensus le plus pertinent parmi la multitude de consensi MEME générés par motif, nous avons choisi de nous baser sur les résultats de l'analyse manuelle pour étudier l'évolution moléculaire. Ces résultats ne tiennent donc pas compte de toutes les séquences, seulement celles dont l'occurrence est supérieure à 0,025% du total des séquences de la sous-librairie (**Figure 42**).

L'enrichissement étant faible dans les premiers cycles, peu de séquences répondent au critère des 0,025%. La quasi-totalité des séquences sont donc définies comme indéterminées puisque non-traitées (tracé noir). Comme vu dans la section Résultats-3.5.3, le fort enrichissement entre les cycles 6 et 7 entraîne une forte augmentation des séquences traitées parmi lesquelles plus de 95% correspondent au motif Orange (**Figure 42A**). Seuls les motifs Orange, Mauve et Rose vont dépasser la barre des 5% de représentativité totale dans une sous-librairie au cours du Cell-SELEX.

L'émergence du motif Mauve à compter du cycle 11 s'accompagne d'une décroissance du motif Orange. De plus, la comparaison du taux de représentativité de ces deux motifs entre les séquences sélectionnées sur les NIH:OVCAR3 et celles liées sur les SK-OV-3 nous mène à penser que le motif mauve est un candidat semblant plus particulièrement cibler les cellules NIH:OVCAR3. En effet, lors de l'étape de contre-sélection, ce sont majoritairement des séquences Orange qui se lient au SK-OV-3 alors qu'elles sont sous-représentées vis-à-vis des séquences Mauve avant incubation.

Pour la plupart des motifs mis à part le Mauve, on observe une plus forte représentativité dans la sous-librairie issue de la contre-sélection pour un cycle donné en fin de SELEX. Tous ces motifs semblent donc lier les cellules SK-OV-3 exceptées les séquences Mauve.



**Figure 42 : Evolution de la représentativité des motifs après l'analyse visuelle des séquences surreprésentées.** Les motifs ont été recherchés dans chaque séquence surreprésentée (dont l'occurrence représente plus de 0,025% de la sous-librairie). Les représentativités des 5 motifs principaux (A) et des 4 motifs mineurs (B) sont calculées en fonction du nombre de séquences total de la sous-librairie.

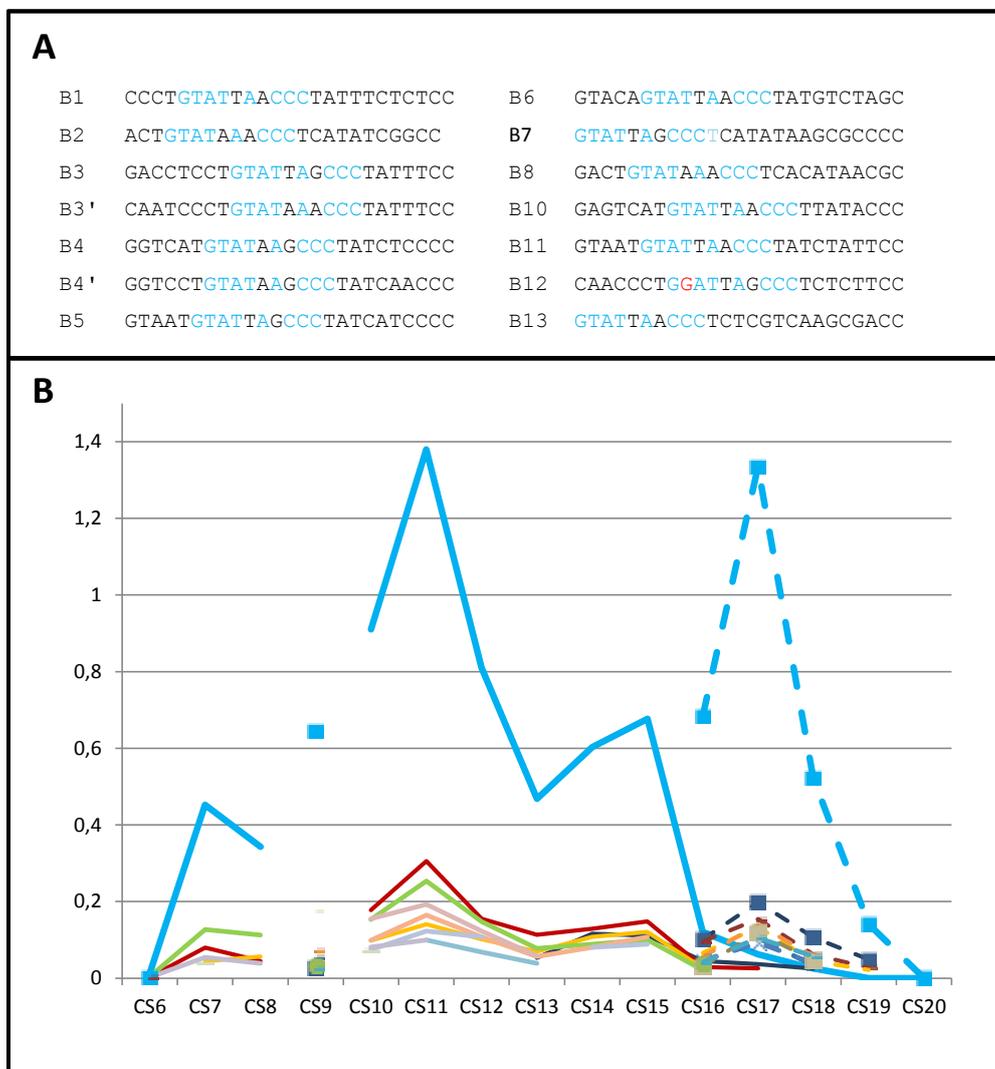
### 3.5.6 Evolution des séquences au sein des populations de motifs

Nous avons étudié la dynamique des séquences individuelles au sein des 6 principaux motifs en recherchant l'occurrence des séquences individuelles majeures de chaque motif. Ces séquences ont été nommées en leur attribuant la première

Sélection d'Aptamères Ciblant la Mucine16

lettre de leur motif couleur suivi de leur ordre d'apparition (toutes les séquences du motif Orange sont donc nommées Ox où x est leur ordre d'apparition). Le but de cette recherche est d'identifier le candidat le plus prometteur du motif, celui qui sera testé en priorité pour son affinité envers les cellules NIH:OVCAR3.

Sur les 6 motifs dont les évolutions des séquences majeures ont été déterminées (mauve, orange, vert, bleu, rose et dragée), nous constatons que dans 3 cas sur 6, toutes les différentes séquences du motif évoluent en parallèle comme observé pour le motif bleu (**Figure 43**). Dans ce cas, nous avons sélectionné la séquence dont la représentativité est la plus importante au sein du motif (B2 ici, courbe rouge).

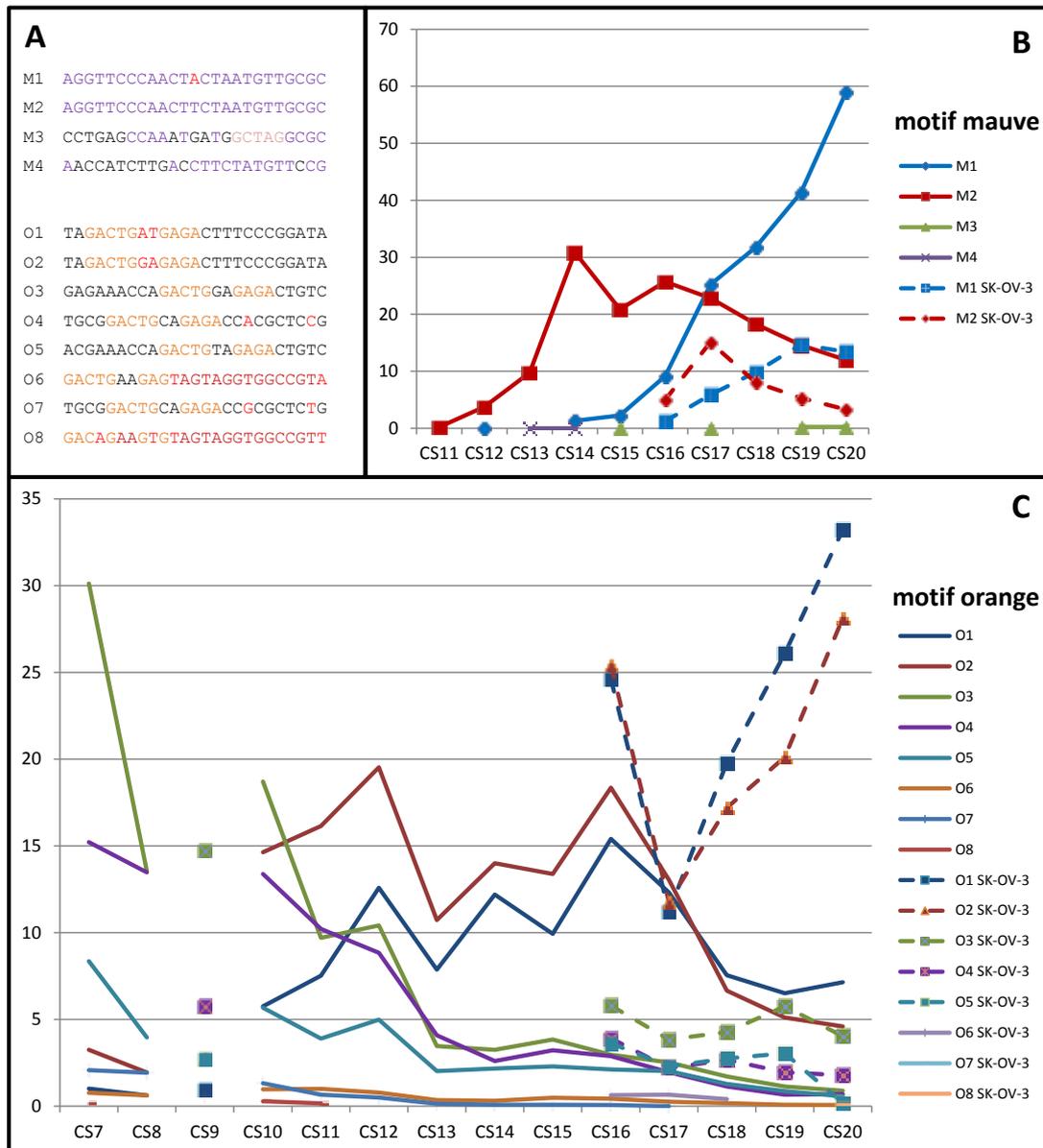


**Figure 43 : Evolution de la représentativité des séquences du motif Bleu.** Les séquences les plus fréquentes à l'intérieur du motif Bleu (Bx) sont représentées en A. Les évolutions de chacune de ces séquences au sein des sous-librairies sont

## Sélection d'Aptamères Ciblant la Mucine16

représentées en **B** par le pourcentage de représentativité dans chaque sous-librairie sélectionnée (trait plein) et contre-sélectionnée (trait pointillé).

Pour les motifs Orange et Mauve, nous avons observé des évolutions croisées entre les séquences d'un même motif (**Figure 44**). Le motif Mauve ne comprend que 4 séquences majoritaires identifiées (**Figure 44A**). La surreprésentation de ce motif n'apparaît qu'au cycle 11 avec l'enrichissement de la séquence M2 (**Figure 44B**).



**Figure 44 : Evolution de la représentativité des séquences des motifs Mauve et Orange.** Les séquences les plus fréquentes à l'intérieur des motifs Mauve (Mx) et Orange (Ox) sont représentées en **A**. Les évolutions de chacune de ces séquences au sein des sous-librairies sont représentées en **B** et **C** par le pourcentage de représentativité dans chaque sous-librairie.

La séquence M1 ne diffère que d'une base de la séquence M2, mais son apparition et son enrichissement rapide entraîne un arrêt de l'enrichissement en M2 et même son déclin au sein des sous-librairies. La séquence M1 présente donc un avantage compétitif vis-à-vis de la séquence M2. De plus elle continue à s'enrichir pendant la phase accrue de contre-sélection à partir du cycle 15 contrairement aux autres séquences, y compris au sein des autres motifs. Parmi ces séquences du motif Mauve majoritaire en fin de Cell-SELEX, nous avons choisi de pratiquer des tests de liaison sur les cellules NIH:OVCAR3 avec les séquences M1 et M3, ainsi qu'avec une séquence longue correspondant à la bande haute comprenant une séquence M1 et une séquence M2 (séquence M1-M2).

Concernant le motif Orange (**Figure 44A**), alors que les séquences O3, O4 et O5 sont l'essentiel des séquences du motif dans les 9 premiers cycles de SELEX, leur représentativité s'effondre à compter du cycle 10 au profit des séquences O1 et O2 (**Figure 44C**). Il est à noter que le cycle 9 a fait l'objet d'une contre-sélection et a pu contribuer à ce changement de population. La séquence O2 a été choisie car elle présente un avantage compétitif vis-à-vis de O3, O4 et O5 et qu'elle est surreprésentée vis-à-vis de O1.

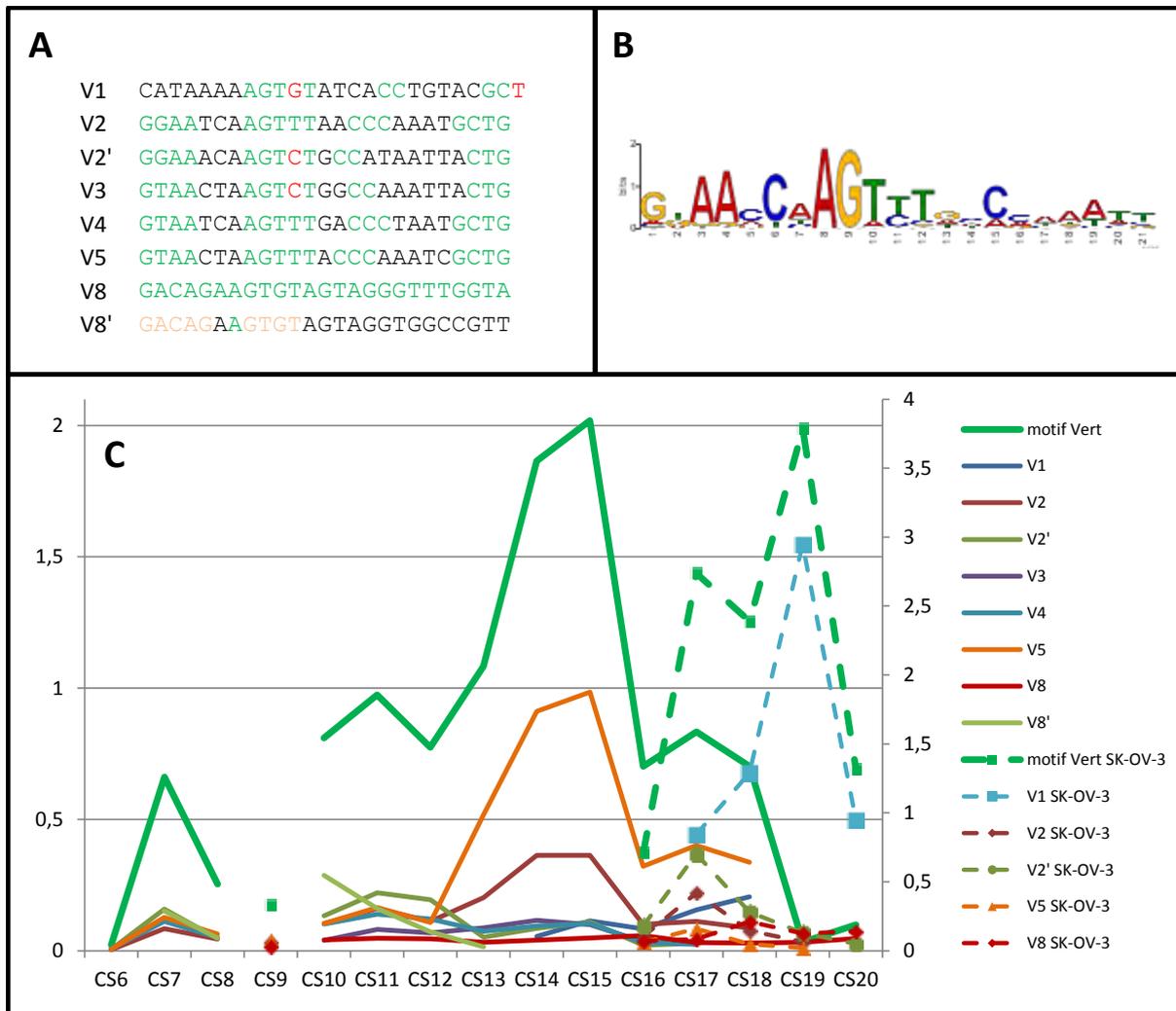
La séquence O8 a également été choisie pour les tests d'affinité car elle constitue le meilleur représentant du motif Rouge.

Le motif Vert est très diversifié et ne se fixe jamais sur quelques séquences surreprésentées qui prendraient largement le dessus sur les autres (**Figure 45A et 45B**). Toutes les séquences de la population évoluent en même temps aussi bien dans leur émergence que dans leur disparition (**Figure 45C**). Elles atteignent un maximum de représentativité dans la sous-librairie générée à l'issue du cycle 15.

La contre-sélection systématique à partir du cycle 15 conduit à l'extinction de la représentativité du motif vert au sein des sous-librairies sélectionnées et à son enrichissement dans les séquences contre-sélectionnées. Ce qui tend à démontrer que le motif vert reconnaît une cible aussi bien présente sur les cellules NIH:OVCAR3 que sur les cellules SK-OV-3. La séquence V5 possède la représentativité majeure du motif Vert, cependant l'extinction du motif suite aux

## Sélection d'Aptamères Ciblant la Mucine16

contre-sélections systématique n'en font pas un bon candidat. Aucune séquence du motif n'a été utilisée dans les tests de liaison aux cellules.



**Figure 45 :** Evolution de la représentativité des séquences du motif vert. Les séquences les plus fréquentes à l'intérieur du motif vert ( $V_x$ ) sont représentées en **A**. Le motif MEME généré à partir des séquences de la sous-librairie du cycle 14 (**B**). Les évolutions de chacune de ces séquences au sein des sous-librairies sont représentées en **C** par le pourcentage de représentativité dans chaque sous-librairie sélectionnée (échelle de gauche) et contre-sélectionnée sur les cellules SK-OV-3 (échelle de droite).

Les séquences retenues pour des tests de liaison sont donc les séquences M1, M1-M2, M3, O2, O8, B2 et R1 (motif Rose).

### 3.6 Comparaison des résultats de clonage et de séquençage haut-débit

#### 3.6.1 *Représentativité des séquences et évolution des populations*

Nous avons recherché les séquences majoritaires des différents motifs identifiées en haut-débit dans les données de clonage. Pour les deux motifs principaux Orange et Mauve, la plupart des séquences majeures ont été observées en clonage (O1, O2, O3, O4, O5 et O6 ; M1, M2, M3 et M4). Les séquences R1, R2 et R2' du motif Rose sont également présentes. Seule la séquence B5 a été clonée parmi le motif Bleu. Aucun variant majoritaire du motif Vert n'a été observé, ce qui est cohérent avec la forte diversité observée dans ce motif.

Bien que les données ne puissent être comparées que sur les cycles 14 à 20, les évolutions de motifs entre les données de clonage et de séquençage haut débit sont divergentes sur certains points (**Figures 36 et 42A**) :

- Les deux motifs majoritaires Orange et Mauve sont bien surreprésentés dans les deux approches. Les autres motifs sont présents en clonage alors leur représentativité très faible en haut-débit laisse penser qu'il aurait été probable de ne pas les observer sur les quelques clones séquencés.
- Le clonage montre un enrichissement en motif Orange sur les cycles 17 à 19 au détriment des autres motifs, alors que le haut-débit montre au contraire un fort enrichissement en motif Mauve notamment au détriment du motif Orange sur ces mêmes cycles.

#### 3.6.2 *Diversité de motifs*

Seulement un motif a pu être identifié dans les séquences surreprésentées en séquençage haut-débit qui n'avait pas été détecté en clonage classique (motif Rouge).

### 3.7 Tests d'affinités sur cellules

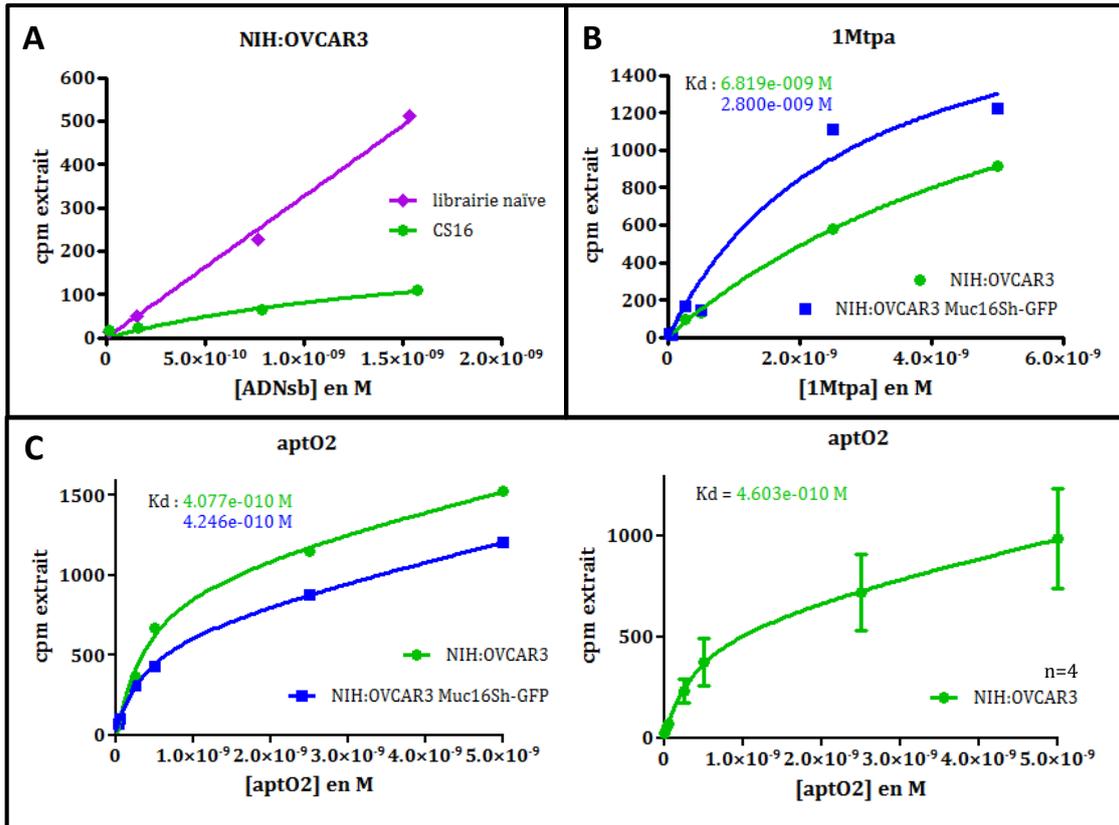
#### 3.7.1 *Marquage radioactif sur cellules platées*

Afin de tester l'affinité des séquences obtenues, nous avons marqué les ADNsb en 5' au  $^{32}\text{P}$  puis effectué une interaction sur cellules avec une gamme de concentrations d'ADNsb de 25 pM à 5 nM (5 femtomoles à 1 picomole).

En comparant la liaison des séquences issues de la sous-librairie du cycle 16 (CS16) avec une librairie naïve sur les cellules NIH:OVCAR3, nous constatons un phénomène de saturation pour les plus fortes concentrations en sous-librairie 16 contrairement à la librairie naïve (**Figure 46A**). Les cellules semblent fixer plus de séquences de la librairie que de séquences issues du SELEX.

Il semble, que les séquences du cycle 16 soient capables de lier de manière spécifique des cibles à la surface des cellules et que le nombre de ces cibles est limitant dans les conditions utilisées. Les séquences de la librairie étant beaucoup plus diversifiées, certaines sont probablement capables de reconnaître de manière peu spécifique un grand nombre de cibles à la surface des cellules et de donner un signal plus important qui n'arrive pas à saturation.

Sélection d'Aptamères Ciblant la Mucine16



**Figure 46 : Tests de radio-liaison sur cellules platées.** Des cellules *NIH:OVCAR3* et *NIH:OVCAR3* sous exprimant la Mucine16 (*NIH:OVCAR3 Muc16Sh-GFP*) platées ont été incubées avec une gamme de concentration de différentes populations de séquences (*librairie naïve* et sous-librairie 16), un candidat aptamère (*aptO2*) et une séquence contrôle. Après lavages, les cellules sont raclées et la radioactivité résultante est comptée (cpm extrait).

Afin de limiter la liaison du contrôle négatif sur nos cellules, nous avons cherché à réduire la diversité de ce contrôle. Pour cela, nous avons choisi de ne plus utiliser une librairie naïve mais une séquence unique. En effet, si la librairie peut reconnaître un très grand nombre de cibles de manière peu spécifique du fait de sa diversité, une séquence unique contrôle ne devrait présenter qu'une faible liaison aux cellules.

Notre premier choix a été d'utiliser comme contrôle négatif la séquence Apt5.5 que nous avons identifiée lors du CE-SELEX contre l'interleukine-8. Les tests de liaison ont montré le même type de courbes de saturation sur les cellules que pour les séquences sélectionnées (données non illustrées). Le calcul de prédiction de structure de la séquence Apt5.5 montre qu'elle est potentiellement capable de se

structurer pour former une plateforme G-Quadruplex (section Résultats-2.1.2 **Figure 22B**). De par cette caractéristique et le fait que cette séquence soit issue d'un SELEX, il n'est pas improbable qu'elle puisse lier un motif à la surface des cellules.

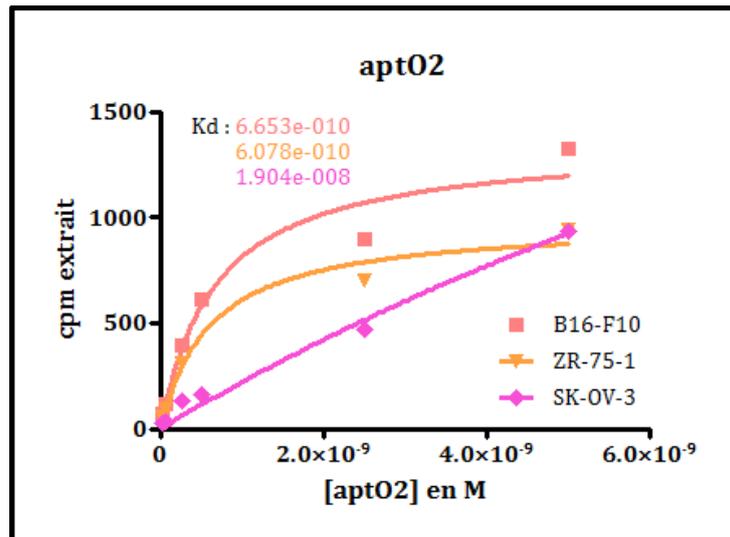
Notre second choix a été d'utiliser comme contrôle la séquence complémentaire à l'aptamère M1 (1Mtpa) afin de pouvoir également l'utiliser dans des expériences d'inhibition de l'interaction de la séquence M1 avec les cellules. Les résultats de liaison montrent que la séquence 1Mtpa donne également une courbe de saturation que ce soit sur les cellules NIH:OVCAR3 ou NIH:OVCAR3 Muc16Sh-GFP (**Figure 46B**) et n'est donc pas un contrôle satisfaisant. La séquence 1Mtpa étant le reverse complémentaire de l'aptamère M1, elle présente les mêmes possibilités d'appariement intramoléculaire. Elle est donc capable de se structurer de la même manière que l'aptamère M1. Il est possible que la liaison de la séquence 1Mtpa aux cellules soit facilitée par cette structuration.

Devant les difficultés rencontrées, nous avons donc choisi d'utiliser une séquence unique comme contrôle négatif de liaison, non issue d'un SELEX et sans structuration prédictible.

La séquence contrôle Rdm1 a été obtenu en randomisant l'ordre des nucléotides présents dans le candidat aptamère M1.

Le candidat aptamère O2 semble présenter une bonne affinité pour les cellules platées, de l'ordre du haut picomolaire pour les lignées cellulaires testées (**Figure 46C**). Cependant il ne semble pas présenter de spécificité pour les cellules NIH:OVCAR3, ni vis-à-vis des cellules NIH:OVCAR3 Muc16Sh-GFP (**Figure 46C**), ni vis-à-vis de la lignée de contre-sélection SK-OV-3 ou les lignées non ovariennes ZR-75-1 et B16-F10 (**Figure 47**). Cependant les séquences contrôles 1Mtpa et Apt5.5 ne montrant qu'une affinité légèrement moins bonne, nous ne pouvons donc pas considérer ces résultats de liaison comme fiables et envisager la présence d'un biais dans cette manipulation. Un contrôle positif est nécessaire afin de pouvoir attester de la fiabilité de ces mesures.

Les difficultés rencontrées pour déterminer la spécificité de liaison par radiomarquage sur cellules platées nous ont conduites à changer de méthode pour tester l'affinité de nos séquences en utilisant la cytométrie de flux.



**Figure 47 : Spécificité de marquage par le candidat aptamère O2.** L'affinité de liaison aux cellules du candidat aptamère O2 a été testée sur la lignée de contre-sélection *SK-OV-3*, la lignée cancéreuse épithéliale mammaire *ZR-75-1* et la lignée de mélanome murin *B16-F10*.

### 3.7.2 Marquage fluorescent sur cellules en suspension

La seconde approche utilisée pour déterminer la spécificité des séquences sélectionnées a été le marquage des cellules par les candidats aptamères couplés à un marqueur fluorescent suivi de l'analyse par cytométrie de flux. Les publications faisant état de Cell-SELEX utilisent très régulièrement la cytométrie de flux pour déterminer la spécificité et l'affinité de leurs aptamères (Kang et al. 2012; Ara et al. 2012; Liang et al. 2012; Ninomiya et al. 2013; Kunii et al. 2011; Wang et al. 2003; Chen et al. 2008; Shangguan et al. 2008; Sefah et al. 2010; Bayrac et al. 2011; Kim et al. 2013). Cette approche nécessite de dissocier les cellules avant de mesurer leur fluorescence. Pour cela nous disposons de deux approches, une enzymatique et l'autre non-enzymatique.

L'approche enzymatique consiste en la digestion trypsique non-spécifique des protéines d'adhérence sur la surface cellulaire. Ceci peut entraîner la disparition des aptatopes protéiques reconnus par les aptamères. Les études utilisant la digestion trypsique comme moyen de dissociation cellulaire nécessitent donc souvent la réexpression durant une à deux heures des marqueurs de surface avant la mise en interaction avec les candidats aptamères. Or, pendant ce laps de temps seules les

protéines en cours de maturation dans les cellules au moment de la trypsinisation seront exprimées. Etant donné la très grande taille de notre cible Mucine16, nous avons considéré que cette approche enzymatique n'était pas appropriée, puisque le temps de réexpression ne serait vraisemblablement pas suffisant pour réexprimer notre protéine d'intérêt en grande quantité.

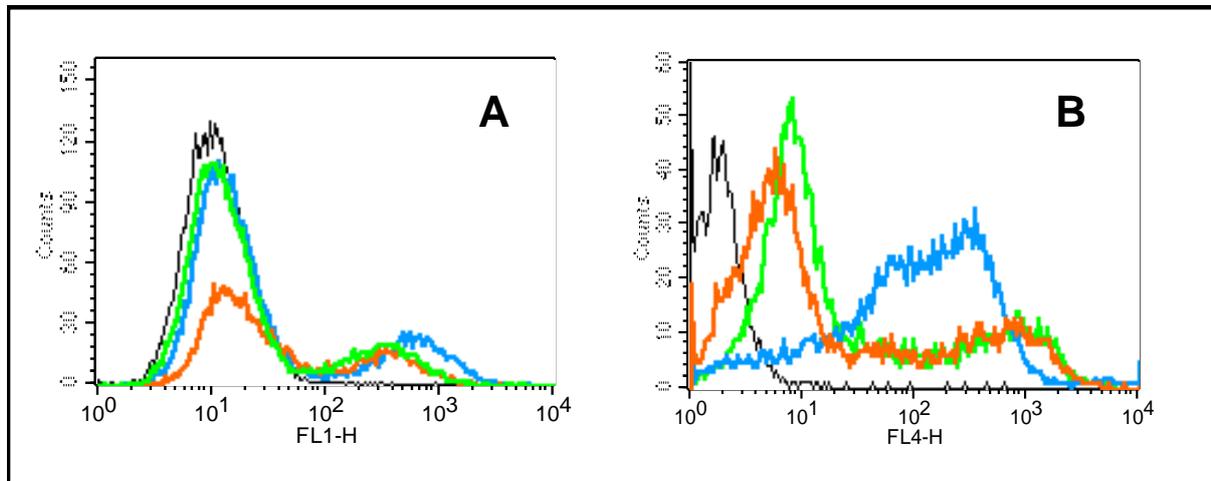
Nous avons donc opté pour une approche non-enzymatique en décrochant les cellules du fond de la flasque de culture par incubation dans une solution à 100 mM EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique). L'EDTA chélate les ions divalents qui sont nécessaires à l'établissement d'interactions ioniques entre le revêtement de la flasque et les protéines de surface des cellules ou entre les cellules, provoquant leur mise en suspension. Ce traitement permet de ne pas affecter les protéines de surface et donc de conserver tous les aptatopes dans leur état natif (Ninomiya et al. 2013; Shangguan et al. 2008; Sefah et al. 2010; Liu et al. 2012).

Les premiers résultats montrent des comportements différents selon le fluorophore utilisé :

- Avec le marquage Fluorescéine (FAM) (**Figure 48A**), nous observons le déplacement d'une sous-population de cellules NIH:OVCAR3 marquée que ce soit par la librairie 5 naïve, le candidat aptamère M1 ou la séquence contrôle Rdm1.
- Avec le marquage Cyanine5 (**Figure 48B**), nous observons que toute la population de cellules NIH:OVCAR3 est déplacée vers des intensités de fluorescence plus fortes en présence de séquences marquées à la Cyanine5 (librairie, candidat ou contrôle). Il est à noter que les profils obtenus pour la librairie selon les deux types de marquage est très différent ; La Cyanine5 entraînant un fort marquage de toute la population. Les profils des séquences uniques (candidats et contrôle) sont similaires entre les deux types de marquage, même si le marquage Cyanine5 entraîne un décalage de toute la population.

Le marquage Cyanine5 semble apporter un biais et il a déjà été reporté dans la littérature la possibilité d'un marquage des mitochondries par ce fluorophore lorsqu'il est couplé à un oligonucléotide (Lorenz et al. 2011). Nous avons choisi de ne plus utiliser de séquences couplées directement à la Cyanine5 pour nos futures

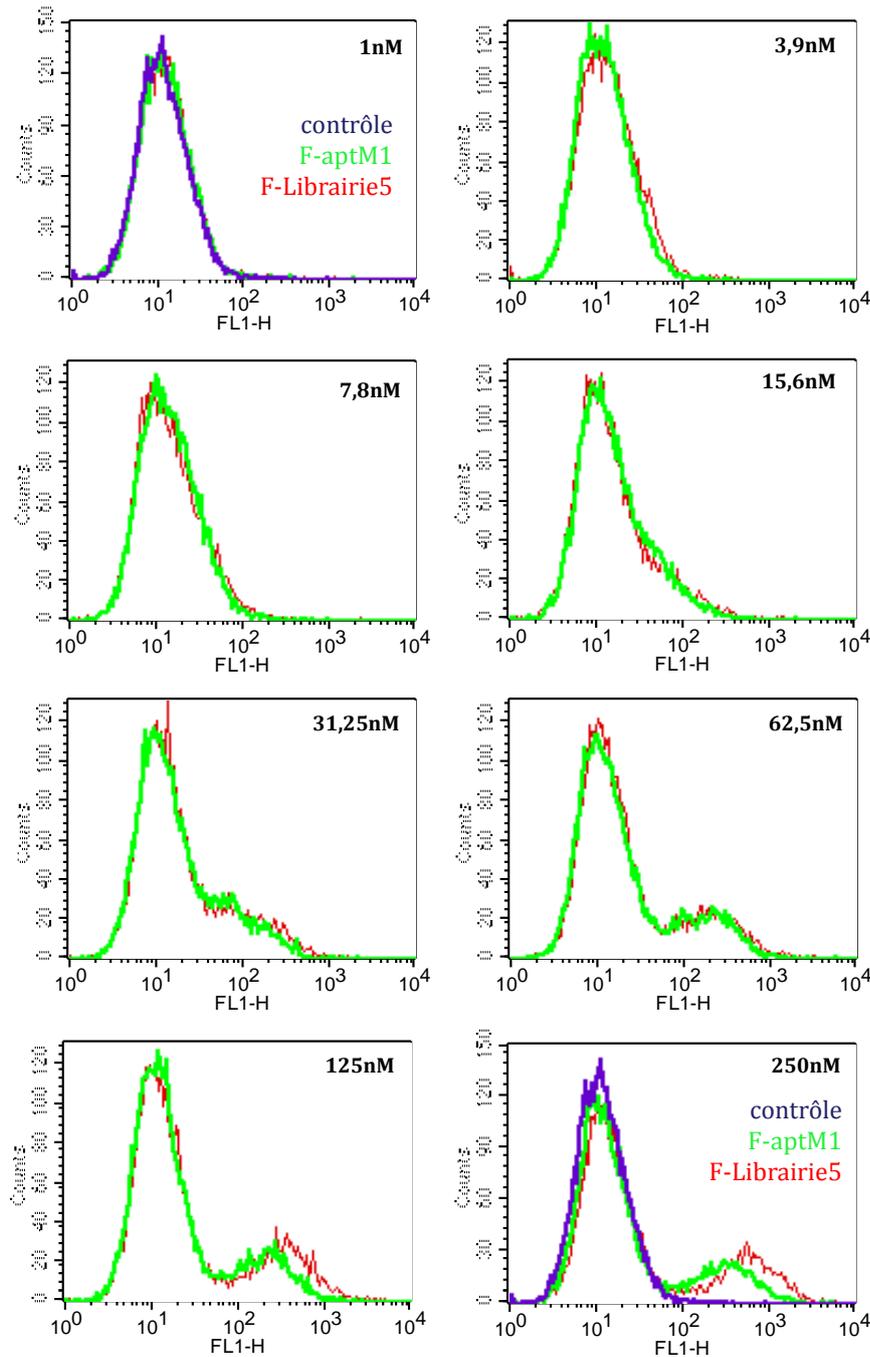
investigations hormis sur les cellules NIH:OVCAR3 Muc16Sh-GFP qui ne permettent pas d'utiliser de marqueur ayant un spectre d'émission dans la gamme de la GFP.



**Figure 49 : Comparaison des marquages par des séquences 5'-FAM et 5'-Cyanine5.** Les profils de fluorescence obtenus avec la Librairie 5 (tracés bleus), la séquence contrôle Rdm1 (tracés oranges) et les candidats (tracés verts) Fam-M1 (A) et Cy5-O2 (B) sont comparés aux cellules non marquées (tracé noir).

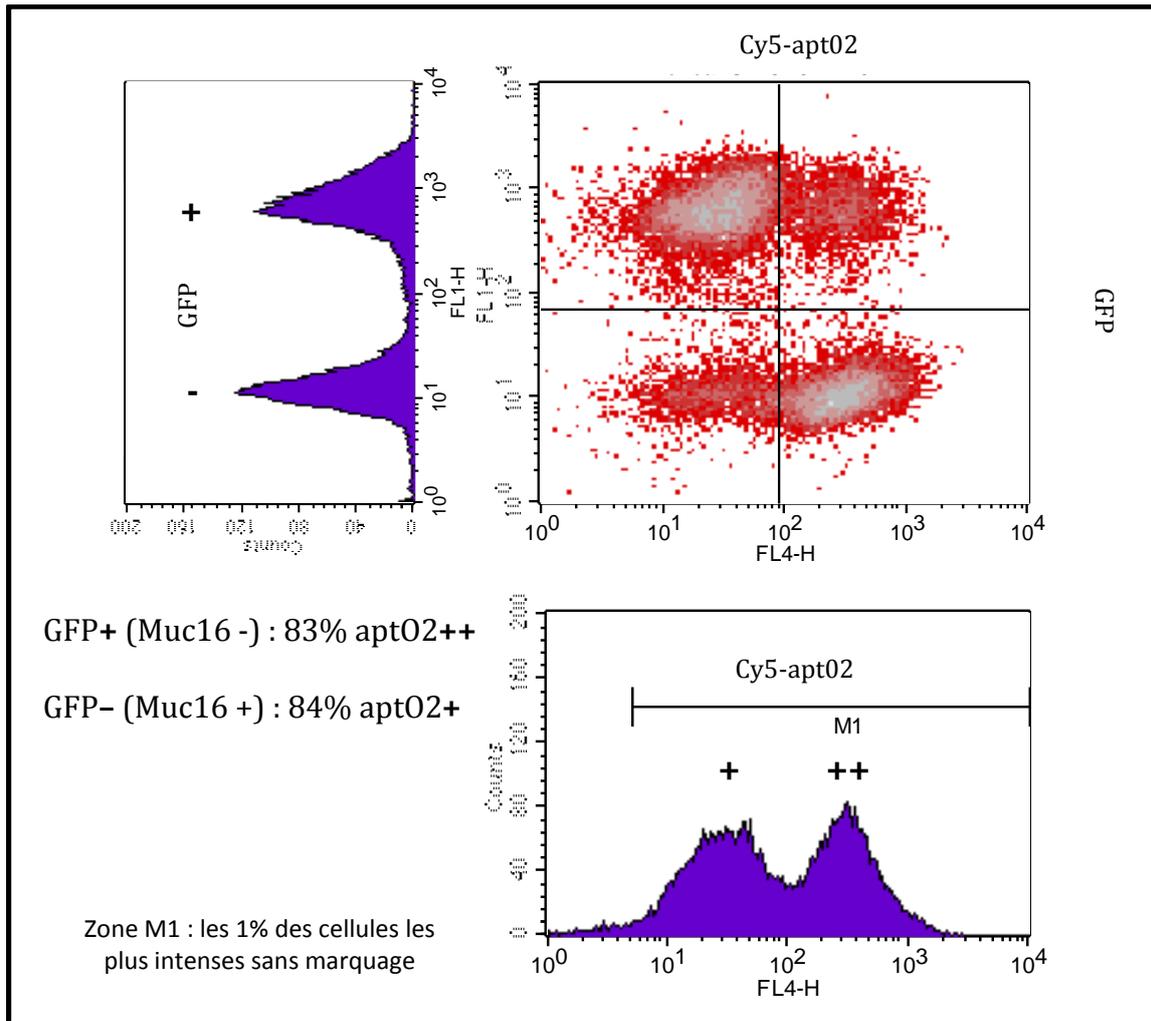
Avec les concentrations de 250 nM utilisées pour les marquages, nous avons constaté la présence d'une sous-population de cellules marquées par les séquences (Librairie, candidat et contrôle). A cette concentration, l'intensité de marquage de la librairie ne peut pas être différenciée de celle obtenue avec le candidat aptamère M1 (**Figure 48A**). Nous avons effectué une gamme de concentration d'ADNs b pour marquer les cellules NIH:OVCAR3 par la librairie et le candidat M1 (**Figure 49**). Ceci afin de déterminer si un marquage plus précoce par le candidat est visible à des concentrations plus faibles.

Nous constatons que pour toute la sous-population sensible au marquage, l'intensité du marquage évolue de manière progressive pour finalement se détacher du pic de la population non-marquée. Sur la gamme de concentrations utilisée (de 1 à 250 nM), aucune n'a permis d'observer une différence entre la liaison de la librairie et du candidat. Si ce n'est que la librairie marque plus intensément la sous-population à fortes concentrations. Etant donné la très grande similarité de profils, il semble que les sous-populations marquées par les deux types d'ADNs b soit une même et unique sous-population cellulaire.



**Figure 50 : Marquage progressif d'une sous-population cellulaire NIH:OVCAR3.**

Nous avons marqué une même quantité de cellules NIH:OVCAR3 par une gamme allant de 1 nM à 250 nM de *librairie5* ou du candidat aptamère *M1* marqués à la fluorescéine. Le *contrôle* correspond à l'intensité de fluorescence détectée sur les cellules NIH:OVCAR3 seules.

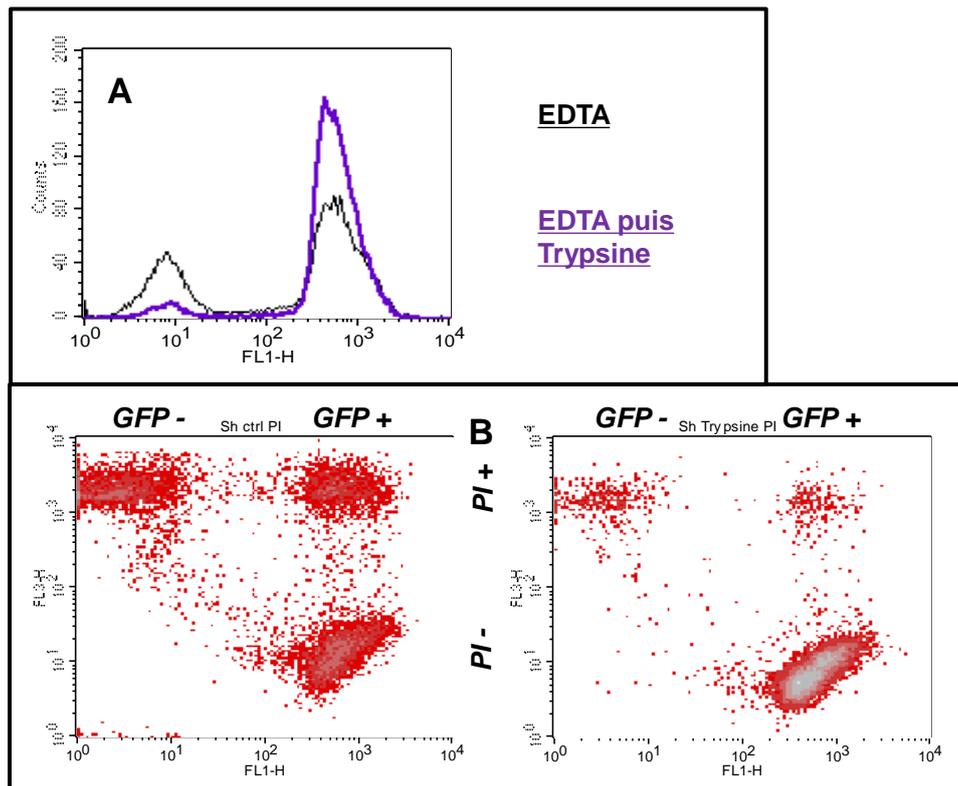


**Figure 51 : Marquage des cellules NIH:OVCAR3 Muc16Sh-GFP par le candidat aptamère O2.** La séquence O2 est marquée à la Cyanine5 en 5' et est observée dans le canal FL4-H. L'expression de la GFP dans les cellules NIH:OVCAR3 Muc16Sh-GFP est contrôlée dans le canal FL1-H.

Le candidat aptamère O2 marqué à la Cyanine5 a été testé pour sa liaison sur les cellules NIH:OVCAR3 Muc16Sh-GFP (**Figure 51**). La barre « M1 » du canal FL4-H correspond à la zone contenant 2% des cellules les plus marquées du contrôle sans aptamère. Toutes les cellules de la population sont déplacées vers des intensités de fluorescence plus fortes en présence de l'aptamère Cy5-O2. Les résultats montrent deux populations de cellules : une population GFP (+) et une population non GFP (-). Si l'on corrèle l'expression de la GFP au marquage Cyanine5, la culture de cellules NIH:OVCAR3 Muc16Sh-GFP présente une population GFP positive dont 83% fixe une faible quantité du candidat aptamère O2

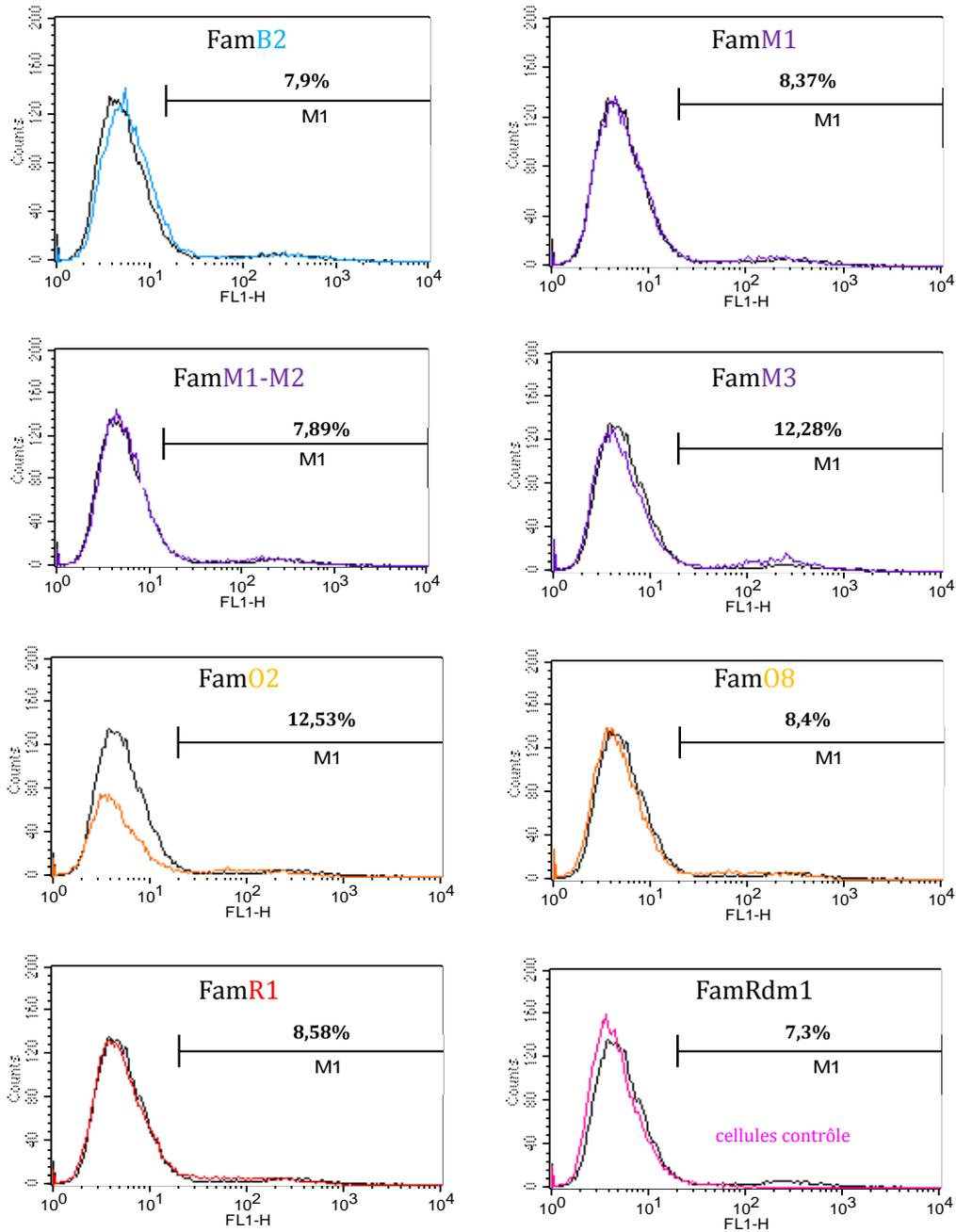
(+) et une seconde population de cellules GFP négative fixant majoritairement (à 84%) le candidat aptamère O2 en grande quantité (\*\*). L'observation de deux populations de cellules quant à l'expression de la GFP semble indiquer une hétérogénéité de profils d'expression du ShRNA Muc16 comme observé dans la section Résultats-2.2.1. Le candidat aptamère O2 est capable de se fixer à toutes les cellules mais plus particulièrement aux cellules GFP négatives. Cette observation porte à croire que l'aptamère O2 est affin et spécifique de la protéine Mucine16 ou d'une molécule associée à sa présence.

Cependant, nous avons formulé une autre hypothèse expliquant ce marquage particulier à la suite de tests que nous avons pratiqué sur ces cellules quant aux capacités de reconnaissance de l'aptamère après traitement tryptique des cellules. Cette approche de traitement enzymatique est fréquemment observée lorsqu'une liaison est caractérisée sur les cellules. Le traitement des cellules à la trypsine ou à la protéinase K permet de dégrader de manière non spécifique les protéines présentes à la surface cellulaire. Si la liaison est toujours observée après ce traitement, c'est que la cible de l'aptamère n'est probablement pas de nature protéique (Kang et al. 2012; Chen et al. 2008; Sefah et al. 2010; Bayrac et al. 2011; Liu et al. 2012; Jiménez et al. 2012; Shangguan et al. 2006). Nous avons décroché les cellules NIH:OVCAR3 Muc16Sh-GFP par la méthode non-enzymatique EDTA puis les avons ou non soumises à un traitement tryptique (**Figure 52**). La première observation du profil GFP (FL1-H **Figure 52A**) permet de constater que la proportion de population non-GFP est variable d'une expérience à l'autre. Le traitement tryptique entraîne une forte diminution de cette population non-GFP, passant de 30% avant traitement à 4% après traitement. Lorsque l'on incube ces cellules avec de l'Iodure de Propidium (PI), on constate que 100% des cellules non-GFP (**GFP-**) sont marquées au PI (**PI+**). Le marquage PI est classiquement utilisé pour marquer les cellules perméables ou mortes, dont le compartiment nucléaire est directement accessible depuis le milieu extracellulaire (le PI étant un intercalant de l'ADN). Il semble donc que le décrochage non-enzymatique entraîne la perméabilisation d'une sous-population de cellules dont le compartiment nucléaire est accessible et que le traitement tryptique permet de réduire la proportion de cette sous-population. Probablement en dégradant complètement ces cellules.



**Figure 52 : Etude de la sous-population marquée.** Les cellules NIH:OVCAR3 Muc16Sh-GFP ont été incubées décrochée de manière non-enzymatique à l'EDTA suivi ou non d'un traitement à la trypsine (A). Le marquage au Iodure de Propidium (PI) permet de mettre en évidence une sous-population de cellules perméables (B).

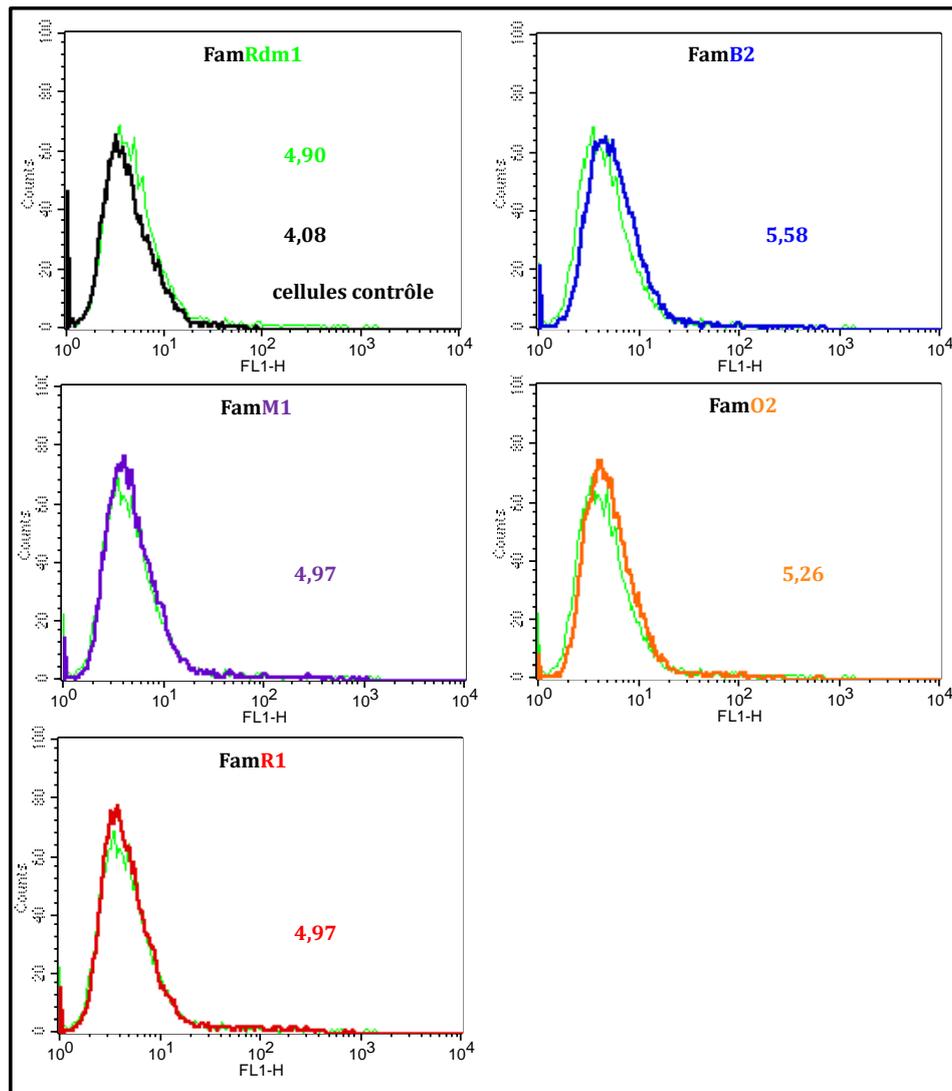
Afin de limiter la proportion de cette sous-population perméable de cellules, nous avons désormais effectué un traitement systématique à la trypsine pour décrocher les cellules avant leur passage en FACS. Les cellules sont ensuite laissés en culture en suspension durant 1h45 afin de réexprimer une partie des protéines de surface. Les tests de liaison effectués après décrochage enzymatique montrent la quasi absence de population fortement marquée, donnant du crédit à notre hypothèse (Figure 53). Les marquages avec les différents candidats ne permet pas de mettre en évidence de façon de fort déplacement des intensités de marquage par rapport à la séquence contrôle Rdm1. Cependant un léger déplacement est observé avec la séquence B2. Le traitement trypsique trop drastique des cellules a pu avoir pour effet d'éliminer la totalité des aptatopes et empêcher toute fixation spécifique. Le temps de réexpression relativement court ne permettant pas aux méga-protéines comprenant un grand nombre de modifications post-traductionnelles comme la Mucine16 d'être réexprimées en grande quantité.



**Figure 53 : Comparaison du marquage des cellules NIH:OVCAR3 (digestion trypsique forte) par les candidats aptamères marqués à la fluorescéine en 5'. Le profil obtenu avec la séquence FamRdm1 contrôle sert d'étalon pour comparer le déplacement provoqué par les candidats aptamères sélectionnés. La zone « M1 » correspond aux 2% de cellules ayant des intensités de fluorescence les plus fortes sur les cellules contrôle sans aptamère. Les pourcentages indiqués correspondent au pourcentage de cellules dans la zone « M1 » après incubation avec la séquence marquée à la fluorescéine.**

## Sélection d'Aptamères Ciblant la Mucine16

Nous avons alors adapté notre protocole en rendant les cellules faiblement adhérentes par une digestion trypsique à J-1 puis une légère digestion à J=0 suivie de 3 h de réexpression en suspension (**Figure 54**). Les résultats de liaison obtenus sont sensiblement les mêmes, la séquence B2 entraînant un léger décalage des intensités vers des valeurs plus fortes. La séquence O2 marque légèrement les cellules.

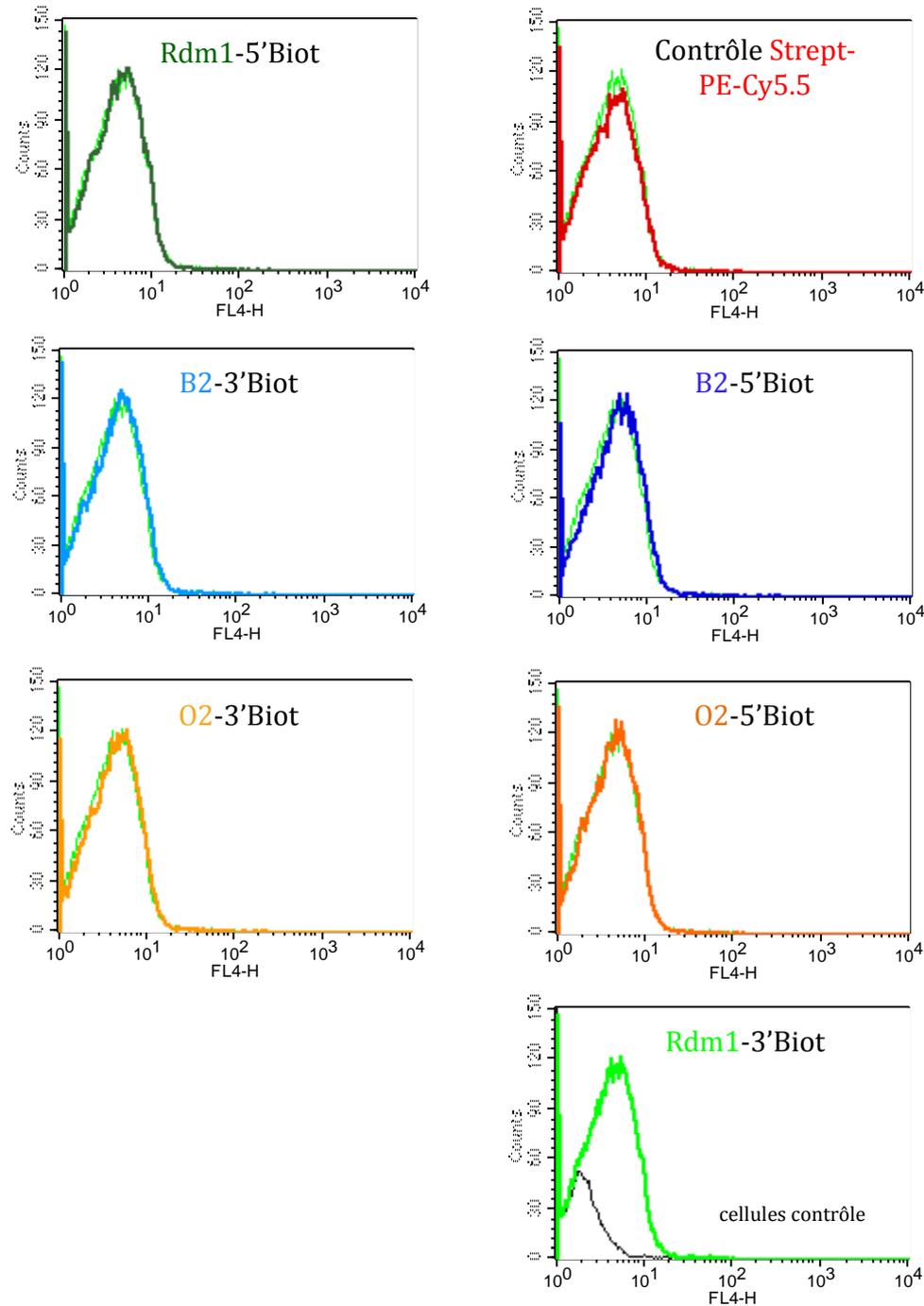


**Figure 54 :** Comparaison du marquage des cellules NIH:OVCAR3 (digestion ménagée) par les candidats aptamères marqués à la fluorescéine en 5'. Le profil obtenu avec la séquence Fam-Rdm1 contrôle sert d'étalon pour comparer le déplacement provoqué par les candidats aptamères sélectionnés. Les valeurs indiquées sont les intensités moyennes de fluorescence pour chaque population marquée. Les cellules contrôle n'ont pas été mises en présence de séquences marquées.

Le traitement plus doux n'a pas permis d'observer un marquage franc. Les conditions nécessaires à l'élimination de la sous-population perméable entraînent la raréfaction des cibles. Comme chaque séquence n'est couplée qu'à un seul fluorophore en 5', il est nécessaire d'en fixer une grande quantité pour l'observer. Nous avons finalement opté pour l'utilisation d'un système d'amplification de signal (Berezovski et al. 2008). Nous avons utilisé des candidats biotinylés et une construction fluorescente comprenant de la streptavidine est rajoutée une fois les aptamères fixés à leur cible. Cette approche semble se généraliser dans les Cell-SELEX et présente plusieurs avantages : elle permet l'amplification du signal, le choix du fluorophore après PCR et l'utilisation des ADNsb biotinylés pour d'autres applications.

La construction d'amplification utilisée est composée de streptavidines, couplées à de la Phyco-Erythrine, elle-même marquée à la Cyanine5.5. La Phyco-Erythrine et la Cy5.5 émettent toutes deux de la fluorescence dans le rouge. Les séquences ont été biotinylées soit en 5', soit en 3' avec une unité de triéthylène-glycol comme espaceur (**Figure 55**). Les résultats montrent un déplacement franc des intensités de fluorescence des cellules avant (tracé noir) et après (tracé rouge) incubation avec la construction. En revanche, les intensités sont les mêmes pour toutes les cellules incubées avec la construction. Aucune différence notable n'est observée entre la séquence contrôle Rdm1 et les candidats B2 et O2. L'amplification n'a pas permis d'augmenter les légers décalages obtenus avec le couplage fluorescéine. Ceci ne signifie pas pour autant que les candidats ne sont pas capables de reconnaître une cible à la surface cellulaire. Il est possible que la liaison de cette construction volumineuse (>200 kDa) entraîne la dissociation du complexe candidat/cible, de même le couplage à la biotine peut empêcher la bonne structuration du candidat, enfin s'il y a internalisation du complexe (malgré les conditions d'interaction à 4°C), la construction ne pourra pas rencontrer la biotine.

L'utilisation de cette construction comme moyen d'amplification semble un bon moyen pour palier la faible variation d'intensité parfois observée avec les séquences directement couplées (Sefah et al. 2010; Bayrac et al. 2011; Liu et al. 2012; Jiménez et al. 2012; Zhang et al. 2012). Cependant un article met en garde sur l'utilisation de streptavidine sur des cellules vivantes. La streptavidine étant capable d'interaction avec des molécules extra-membranaires (Paul et al. 2009).



**Figure 55 : Comparaison du marquage des cellules NIH:OVCAR3 (digestion ménagée) par les candidats aptamères avec marquage secondaire. Toutes les séquences sont biotinyllées soit directement en 5' (5'Biot) soit en 3' avec un espaceur triéthylène glycol (3'Biot). La concentration d'aptamère utilisée est de 250 nM pour chaque échantillon. Le marquage secondaire se fait par incubation dans un second temps avec de la Streptavidine-PhycoErythrine-Cyanine5.5 (Strept-PE-Cy5.5). Le**

profil obtenu avec la séquence *Rdm1-3'Biot* sert d'étalon pour comparer le déplacement provoqué par les candidats aptamères sélectionnés.

La problématique pour tester nos candidats contre la Mucine16 comporte plusieurs aspects :

- Le traitement tryptique nécessaire à l'élimination des cellules perméables entraîne certainement la perte d'aptatopes. Pour vérifier cela, il serait utile de tester la liaison de l'aptamère Mucine1 décrit sur nos cellules après traitement.
- Pour les mêmes raisons, il serait intéressant de pouvoir discriminer les cellules perméables afin de les exclure de l'analyse et éliminer tout le signal indésirable produit par l'accrochage des ADNsb à l'intérieur du compartiment nucléaire. Des tests préliminaires ont été effectués, l'utilisation des marqueurs habituels de cellules mortes tels que le PI est à proscrire. Tous les marqueurs intercalant l'ADN sont capables d'établir des interactions avec les séquences candidates. Des marqueurs de viabilité sont préférables.
- Une façon de réduire la proportion de cellules perméables peut être la diminution de la concentration en  $MgCl_2$  lors de l'interaction. Nous utilisons actuellement 5 mM  $MgCl_2$ , une concentration pouvant entraîner l'apparition de cellules mortes (Avci-Adali et al. 2010).

Comme indiqué dans l'introduction (section I-7.4.5), les travaux de Paul *et al.* ont démontré qu'un Cell-SELEX pouvait échouer dans la sélection d'aptamères spécifiques des cellules cibles de par l'utilisation de billes recouvertes de streptavidine pour la purification de l'ADNsb. Ils décrivent le décrochage d'une partie de la streptavidine de son support lors de l'éluion puis la fixation de cette streptavidine contaminante aux cellules lors de l'incubation. La streptavidine étant une cible « propice » à l'isolement d'aptamères (8 SELEX ont donné des aptamères de haute affinité anti-streptavidine), la population de séquences a évolué au cours du Cell-SELEX vers des séquences affines pour cette protéine. Si nous avions eu connaissance de ces travaux plus tôt, nous aurions pu prendre des précautions afin de tenter d'éliminer la streptavidine avant l'incubation avec les cellules. Cependant, le fait d'effectuer la contre-sélection sur les cellules SK-OV-3 avant l'étape de

sélection a pu permettre à ce que la streptavidine se fixe à ces cellules entraînant par là même l'élimination de séquences anti-streptavidine avant l'étape de sélection sur les NIH:OVCAR-3. Il serait alors intéressant de tester l'affinité de nos séquences issues du Cell-SELEX pour la streptavidine afin de s'assurer que l'évolution a bien été dirigée par la présence des cellules. Bien que ce biais soit bien argumenté, des Cell-SELEX ont pu être menés à bien et permettre l'identification d'aptamères affins et spécifiques pour les cellules en utilisant la purification d'ADNs sur colonne streptavidine (Kang et al. 2012; Shangguan et al. 2008; Liu et al. 2012; Shangguan et al. 2006; Kim et al. 2013).

## 4 SELEX GFP sur Billes Magnétiques :

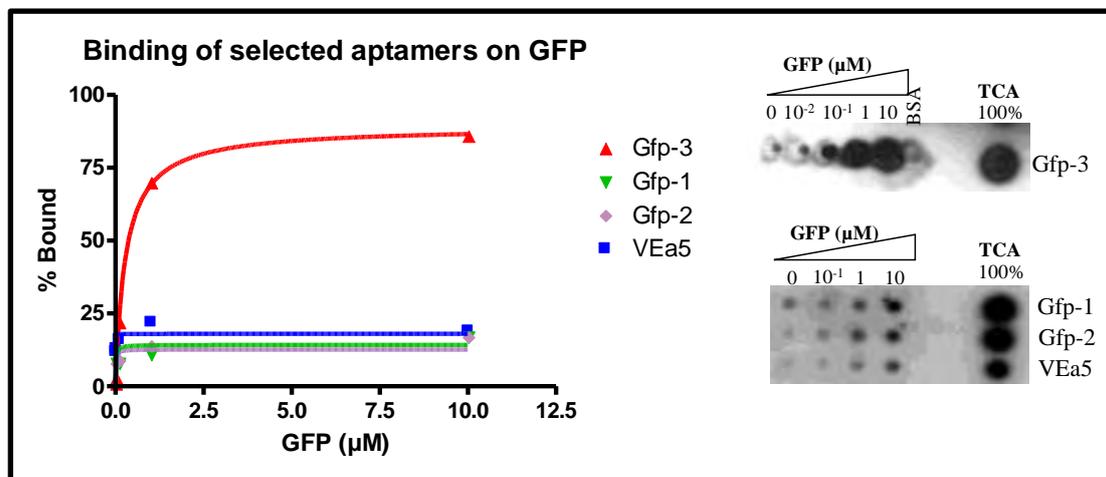
Cette partie reprend d'anciens résultats obtenus dans l'équipe et les combine à l'analyse haut-débit pratiquée au cours de cette thèse. Elle illustre la difficulté à prouver l'affinité des candidats aptamères et la disparité des résultats obtenus en clonage et en séquençage haut-débit.

Bien que des séquences enrichies aient pu être identifiées dans chaque SELEX effectué, leur affinité pour la cible n'a pas pu être mesurée de façon indiscutable. Les témoins négatifs utilisés n'ont pas montré d'affinité suffisamment basse pour être considérés en tant que tels. L'absence de témoin négatif probant remet en question les mesures d'affinités effectuées sur les candidats aptamères.

Nous avons déjà rencontré des difficultés au laboratoire dans la validation d'aptamères sélectionnés. Un SELEX sur billes magnétiques contre la GFP avait été pratiqué et un fort enrichissement en séquences avait été obtenu (**Figure 56**). Des tests de liaison des candidats identifiés par clonage classique et d'un aptamère témoin (anti-VEGF) avaient été réalisés en utilisant des séquences radio-marquées et un partitionnement sur filtre. Ces mesures avaient permis d'observer une liaison plus spécifique de l'aptamère Gfp-3 par rapport aux candidats Gfp-1 et Gfp-2 et au témoin VEa5 (**Figure 57**). Nous avons cependant choisi de ne pas publier ces résultats à cause d'un manque de reproductibilité de la manipulation.

<b>Round 4</b>			
I-1	ggtattgagggctcgcatc	CCCACGAAGTGTGAATGCGGTGATTAGATGCTCCGTTGGT gatggctctaactctctct	
I-2	ggtattgagggctcgcatc	GGCCGTAAGGTGGACAGATTATCGTACAGGGTA gatggctctaactctctct	
I-3	ggtattgagggctcgcatc	GGCCGTAAGGTGGACAGATTATCGTACAGGGTA gatggctctaactctctct	
I-4	ggtattgagggctcgcatc	CAGCCCATTTCTACCATCAGACCCCTCGTTCCG gatggctctaactctctct	
I-5	ggtattgagggctcgcatc	ACCCCGGATCGGCCGTTCCCTGATATG gatggctctaactctctct	
Gfp-1	I-6	ggtattgagggctcgcatc	CCACAAGGACGGTTCGCCCTGGCT gatggctctaactctctct
<b>Round 10</b>			
Gfp-2	II-1	ggtattgagggctcgcatc	TAAATCGGGCGGGCGGGTTTATATTGCTTCTGGACTT gatggctctaactctctct
	II-2	ggtattgagggctcgcatc	TAAATCGGGCGGGCGGGTTTATATTGCTTCTGGACTT gatggctctaactctctct
	II-3	ggtattgagggctcgcatc	TAAATCGGGCGGGCGGGTTTATATTGCTTCTGGACTT gatggctctaactctctct
Gfp-1	II-4	ggtattgagggctcgcatc	CCACAAGGACGGTTCGCCCTGGCT gatggctctaactctctct
	II-5	ggtattgagggctcgcatc	CCACAAGGACGGTTCGCCCTGGCT gatggctctaactctctct
	II-6	ggtattgagggctcgcatc	CCACAAGGACGGTTCGCCCTGGCT gatggctctaactctctct
<b>Round 15</b>			
Gfp-3	III-1	ggtattgagggctcgcatc	TGGGGGGATGTATTTGGGGGTTGGCCGGGGTCCCCG gatggctctaactctctct
	III-2	ggtattgagggctcgcatc	TGGGGGGATGTATTTGGGGGTTGGCCGGGGTCCCCG gatggctctaactctctct
	III-3	ggtattgagggctcgcatc	TGGGGGGATGTATTTGGGGGTTGGCCGGGGTCCCCG gatggctctaactctctct
	III-4	ggtattgagggctcgcatc	TGGGGGGATGTATTTGGGGGTTGGCCGGGGTCCCCG gatggctctaactctctct
Gfp-2	III-5	ggtattgagggctcgcatc	TAAATCGGGCGGGCGGGTTTATATTGCTTCTGGACTT gatggctctaactctctct
	III-6	ggtattgagggctcgcatc	TAAATCGGGCGGGCGGGTTTATATTGCTTCTGGACTT gatggctctaactctctct
	III-7	ggtattgagggctcgcatc	GGGAAGGAGAGTTTGGACATGGTGTGGTTGCTGGATGT gatggctctaactctctct
Gfp-1	III-8	ggtattgagggctcgcatc	CCACAAGGACGGTTCGCCCTGGCT gatggctctaactctctct

**Figure 56 : Séquences issues du SELEX contre la GFP.** Des séquences des cycles 4, 10 et 15 ont été clonées et séquencées. Une structure en G-quadruplex est prédite d'après le logiciel QGRS Mapper dans la séquence Gfp-3 en impliquant les nucléotides encadrés.



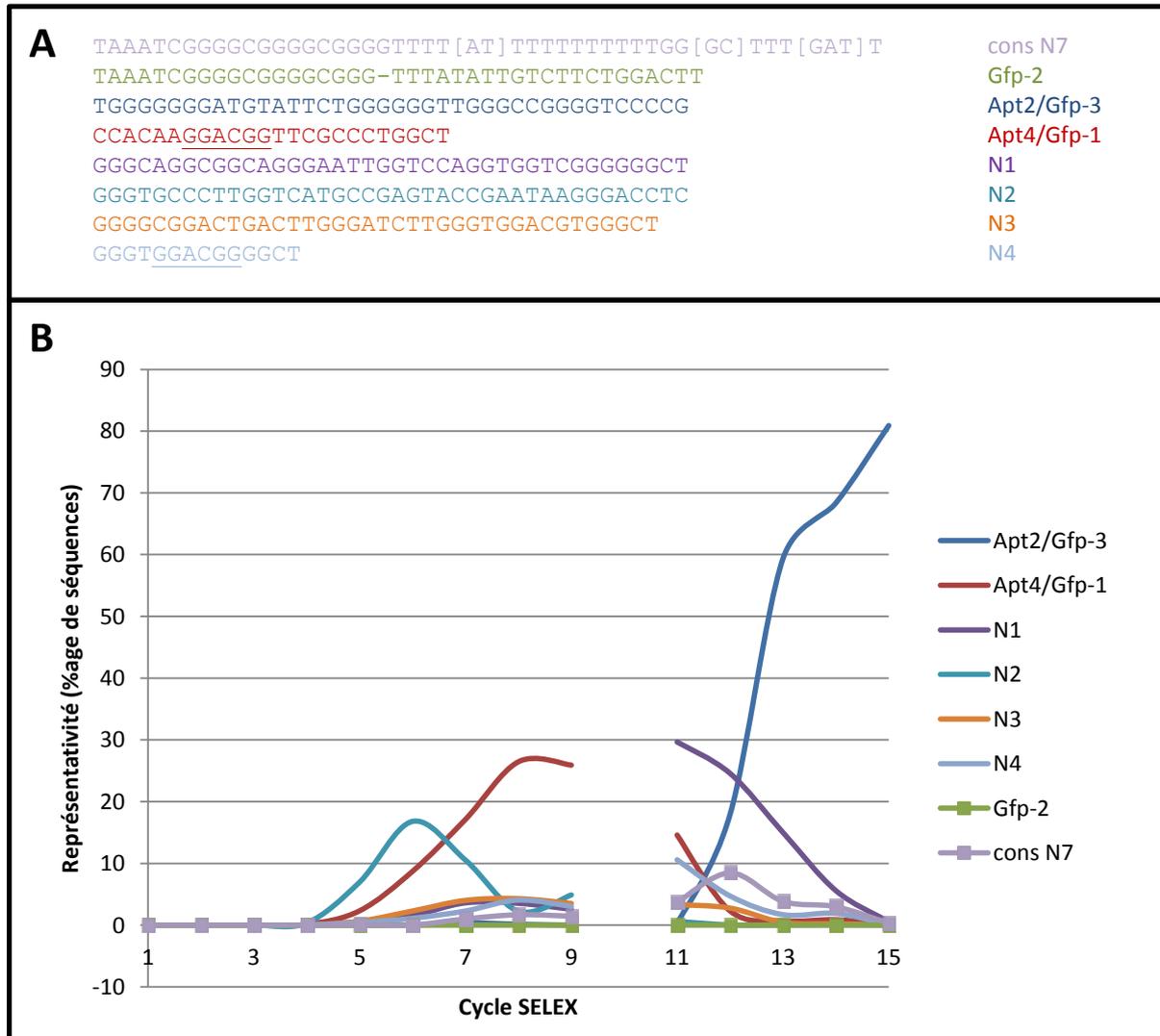
**Figure 57 : Mesure d'affinité sur filtre des candidats aptamères radiomarqués.** Les données sont présentées en pourcentage de candidat lié pour chaque concentration en GFP. Le contrôle VEa5 est un aptamère anti-VEGF.

Les sous-librairies obtenues lors de ce SELEX GFP ont été séquencées en haut-débit en même temps que les nouveaux SELEX (Figure 58). Nous avons comparé les résultats avec ceux obtenus auparavant par clonage classique (Figure 56). Nous constatons un fort enrichissement par les deux approches avec une

prédominance des séquences Gfp-1 et Gfp-3 déjà identifiées par clonage. Cependant, la séquence Gfp-2 n'est présente que dans 3 des 14 sous-librairies GFP (cycles 11, 12 et 14) où elle représente respectivement 0,0005%, 0,004% et 0,002% des séquences totales ; soit au mieux une séquence sur 25 000. Cette représentativité très basse au sein des sous-librairies est très loin de la représentativité en clonage qui était de 50% au cycle 10 et 25% au cycle 15. La séquence Gfp-2 a été identifiée comme faisant partie d'un motif identifié (**cons N7**) en haut-débit. Cependant, même au sein de cette famille, Gfp-2 est l'un des représentants les moins abondants (0,07% du motif au cycle 14).

Il est étonnant de constater de si grandes différences de représentativité pour une même séquence entre les données de clonage classique et de séquençage haut-débit. Un exemple existe dans la littérature où les données à la fois de clonage et de séquençage haut-débit sont disponibles (Schütze et al. 2011). Dans cette étude, les représentativités observées en clonage et en séquençage Illumina n'ont pas été discutées. Il existe pourtant des différences significatives entre les données obtenues par les deux approches. Lors de ce SELEX anti-streptavidine, la séquence majoritaire issue du clonage représente 25% des séquences identifiées au cycle 10 (6 clones sur 24). En recherchant la représentativité de cette même séquence dans les données supplémentaires de séquençage haut-débit, nous constatons qu'elle ne représente que 0,6% de la même sous-librairie du cycle 10. Si l'on se fie à sa représentativité de 0,6% en haut-débit, cette séquence aurait dû être observée une fois sur 16 667 en clonage, et non 6 fois sur 24 clones. Ceci semble mettre en évidence un puissant biais de clonage.

Il est fréquemment évoqué dans la littérature que les meilleurs ligands en termes d'affinités ne sont pas nécessairement les plus abondants en clonage. C'est pourquoi des technologies de criblages d'affinité rapides telles que l'HAPIScreen ont été développées (Dausse et al. 2011). Il serait intéressant de déterminer s'il en est de même pour les données de séquençage haut-débit, les plus abondants ne seront-ils toujours pas les meilleurs ligands ?



**Figure 58 : Evolution de la représentativité des séquences issues du SELEX GFP. Les séquences possédant les meilleures occurrences (A) ont été recherchées dans chaque sous-librairie (B).**

## 5 Utilisation de l'Aptamère Décrit Anti-Mucine1 :

Les sphéroïdes multicellulaires sont décrits pour la première fois dans les années 1970 par Sutherland *et al.* (Sutherland *et al.* 1971). Ces assemblages 3D ont l'avantage d'être plus que de simples cellules en culture monocouches ou en suspension, car ils vont pouvoir représenter une synergie et une complexité proche des tissus, en particulier des tissus tumoraux (Sutherland 1988). En effet, 3 états

cellulaires sont retrouvés dans un sphéroïde : des cellules prolifératives sur les couches externes, des cellules quiescentes au centre du sphéroïde et éventuellement des cellules mortes en son cœur. La présence d'un gradient de nutriment et d'oxygène, qui implique une hypoxie à l'intérieur du sphéroïde entraîne pour certains types cellulaires une nécrose correspondant à un environnement tumoral non vascularisé (Friedrich et al. 2007). La plupart des types cellulaires cultivés en 3D vont sécréter les composants permettant de former une matrice extracellulaire qui peut être un facteur important pour l'accessibilité par les molécules de ciblage (Marrero et al. 2009; Nederman et al. 1984; Santini et al. 2000) comparativement au modèle 2D (Lobjois et al. 2009).

Un grand nombre de types cellulaires tumoraux peuvent être cultivés sous forme sphéroïde (Dongari-Bagtzoglou & Kashleva 2006; Marrero et al. 2009; Wasungu et al. 2009). Il est également possible de co-cultiver plusieurs types cellulaires afin de parvenir à un assemblage cellulaire plus proche de la réalité (Kelm et al. 2003; Marrero & Heller 2012; Nakamura et al. 1999; Wang et al. 2005).

Les utilisations de ce modèle sont diverses et peuvent permettre la compréhension du comportement tumoral (Truchet et al. 2008; Valcárcel et al. 2008). Leur utilisation en tant que modèle pour le criblage de molécules thérapeutiques représente une grande part des travaux menés sur les sphéroïdes (Friedrich et al. 2009; Mehta et al. 2012; Pampaloni et al. 2007; Shin et al. 2013). Ainsi, l'étude de l'effet de médicaments anti-tumoraux réalisée sur sphéroïdes (Chitcholtan et al. 2012; Dufau et al. 2012; Mellor et al. 2005; Pickl & Ries 2009; Prados et al. 2008) montre la pertinence du modèle pour l'évaluation de l'efficacité de ces molécules (Li et al. 2008). L'analyse de l'efficacité se fait également en 3D (Fehlauer et al. 2006; Gibot et al. 2013; Khaitan & Chandna 2006; Monazzam et al. 2007). Finalement les techniques d'administration de médicaments sont testées sur sphéroïdes pour pouvoir déterminer la capacité de pénétration des transporteurs (Bandeekar et al. 2012; Goodman et al. 2007; Kim et al. 2010).

Les aptamères sont décrits comme ayant un potentiel pénétrant plus important au sein des tissus que leurs homologues protéiques anticorps de par leur plus petite taille (section Introduction-3). Nous avons souhaité comparer un anticorps et un aptamère dirigés contre une même cible pour leur capacité à marquer les cellules par

un agent fluorescent. Nous avons utilisé un aptamère identifié par l'équipe de Sotiris Missailidis contre la protéine membranaire Mucine1 et un anticorps analogue M4H2.

L'aptamère Mucine1 nommé S2.2 est un aptamère ADN issu d'une sélection sur colonne chromatographique contre un peptide synthétique de la Mucine1 (Ferreira et al. 2006). Son  $K_d$  est de 40 nM d'après l'étude en SPR effectuée lors de son identification. Il a déjà servi à imager des cellules MCF-7 (cancer du sein) qui surexpriment la Mucine1 en culture 2D. L'étude a porté sur les capacités de marquage de cellules MCF-7 cultivées en sphéroïdes 3D par l'anticorps et l'aptamère.

# Direct Validation of Aptamers as Powerful Tools to Image Solid Tumor

Olivier Martínez,<sup>1,2</sup> Elisabeth Bellard,<sup>1,2</sup> Muriel Golzio,<sup>1,2</sup> Saad Mechiche-Alami,<sup>1,2</sup> Marie-Pierre Rols,<sup>1,2</sup> Justin Teissié,<sup>1,2</sup> Vincent Ecochard,<sup>1,2,\*</sup> and Laurent Paquereau<sup>1,2,\*</sup>

Visualization of cancer cells requires distinguishing malignant from normal cells by objective criteria with high specificity. For several years, tumor markers expressed on the surface of cancer cells have been characterized as cancer signatures, and their labeling with specific imaging probes has revolutionized cancer diagnosis. This specific labeling is also an important tool in surgery tumor ablation. The present study considers the tumor labeling potential of an aptamer that specifically recognizes the epithelial cancer biomarker mucin1 (MUC1). This anti-MUC1 aptamer was investigated *in vitro* in a three-dimensional (3D) environment and compared to an anti-MUC1 antibody for its capacity to visualize cancer cells. Multicellular spheroids of breast cancer MCF-7 cells were used as tumor models and anti-MUC1 fluorescent aptamer and antibody were visualized by fluorescence imaging. Results showed that the antibodies interacted only with cells located on the surface of the spheroid, whereas the anti-MUC1 aptamers were able to penetrate inside these 3D tumor models and thereafter internalized into the cancer cells. Due to their lack of immunogenicity and their facility to be chemically modified, aptamers may replace advantageously the use of antibodies in diagnosis based on imaging setup thanks to their specific detection of cancer cells without invasive surgical procedures or during clinical intraoperative intervention.

## Introduction

**A**MONG THE CANCER BIOMARKERS that have already been identified, most of them are surface antigens over-expressed in cancer cells. These surface biomarkers are ideal targets for imaging because of their direct accessibility. The use of imaging probes directed against specific biomarkers expressed on the surface of cancer cells has allowed specific visualization of tumor cells that has helped guide surgeons during clinical intraoperative intervention. The prostate-specific membrane antigen, the carcinoembryonic antigen (CEA) and some mucin-type glycosated proteins such as mucin1 (MUC1) in epithelial breast cancers or MUC16 in epithelial ovarian cancers have already been identified for targeting tumor cells (Cibiel et al., 2012). MUC1 is currently one of the major cancer biomarkers. It is highly expressed by the majority of cancers cells and, in particular, by primary and metastatic breast cancers (Da Pieve et al., 2009). Recently, a targeted active immunotherapy protocol was designed by the Transgene Company to treat MUC1 expressing solid tumor using a recombinant vaccinia virus and some antibodies against MUC1 have been developed to visualize cancer cells or to target metastatic cancers (Horm and Schroeder, 2013).

For many years, antibodies were considered as the most specific probes for tumor imaging due to their high affinity and their good specificity for surface receptors (Gao et al., 2004; Cohen and Margel, 2012; Kaur et al., 2012). Through extensive studies, their usefulness during intraoperative surgery has been demonstrated (Kaushal et al., 2008; McElroy et al., 2008; Terwisscha van Scheltinga et al., 2011).

Despite their specificity and affinity towards their targets, antibodies present two major restrictions for *in vivo* tumor imaging: (1) their immunogenicity and (2) the difficulty to obtain the chemical modifications needed for their fluorescent labeling. During the last 20 years, antibody fragments (scFv), peptides and aptamers have been developed as alternative approaches to overcome these limitations. But for scFv and peptides, their stability remains a major problem for their use in *in vivo* studies (Worn and Pluckthun 2001; Jin et al., 2013).

Nucleic acid aptamers are nowadays considered as nucleic-antibody analogues and have emerged as new targeting probes with excellent potential for theranostic applications (Cerchia and de Franciscis, 2010; Ruigrok et al., 2011; Zhu et al., 2012). They are classically generated by the SELEX method from synthetic single-stranded DNA or RNA

<sup>1</sup>Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), BP64182, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Toulouse, France.

<sup>2</sup>Université de Toulouse, UPS, IPBS, Toulouse, France.

\*These authors contributed equally to this work.

libraries and are selected for their ability to bind their target antigens with strong affinity and specificity (Mayer, 2009). Because of their small size (< 30 kDa) and their properties as nucleic acids, aptamer synthesis is very well controlled, and a lot of chemical modifications can be introduced in order to get better stabilization, to reduce renal clearance or to conjugate different agents such as imaging dyes. Moreover, their production is at low cost and reproducible, decreasing batch-to-batch variability. An increasing number of labeled aptamers, conjugated to fluorescent molecules, have been developed in order to validate their use in tumor-specific imaging for diagnosis and potentially for intraoperative surgery (Charlton et al., 1997; Gao et al., 2004; Shi et al., 2011; Cibiel et al., 2012; Kim et al., 2012; Bellard et al., 2013).

The anti-MUC1 aptamer is very well described and shows a high affinity (0.135 nM) and good specificity for its target (Ferreira et al., 2006; Baouendi et al., 2012). This aptamer has been shown to successfully recognize and bind to native MUC1 at the surface of the MCF-7 breast cancer cell line in cell culture (Yu et al., 2011; Hu et al., 2012; Wu et al., 2012; Cai et al., 2013) and in tumor-bearing mouse (Da Pieve et al., 2009; Orava et al., 2010; Kurosaki et al., 2012). However, no direct comparison between MUC1 aptamer and anti-MUC1 antibody has been reported.

To better understand the potential of fluorescent aptamers versus fluorescent antibodies, the present study evaluates the use of a fluorophore-labeled anti-MUC1 aptamer as an imaging agent using spheroid assemblies as model tumors. Spheroids as three-dimensional (3D) *in vitro* models provide a relevant alternative to both complex *in vivo* whole organism approaches and two-dimensional (2D) culture with its limitations. Obviously, tissue-specific architecture and organization as well as mechanical and biochemical cues are absent from classical monolayer culturing techniques. Developing 3D cell culture models not only reduces the gap between *in vitro* cell culture and *in vivo* tissues, but also complies with the ethical principles of animal research (Gibot and Rols, 2013). Therefore, 3D models appear appropriate for evaluating the labeling and penetration efficiency of aptamers.

We showed, using a 3D model spheroid of MCF-7 cells, that MUC1 aptamer is a good alternative probe to anti-MUC1 antibody in imaging studies. Coupled with fluorophores, both aptamers and antibodies were able to label cancer cells in the spheroid. Whereas antibodies interact with MUC1 target only at the surface of the spheroid, aptamers were able to penetrate deeply in the core of these 3D tumor models.

We clearly demonstrated the accessibility of inner cells in the spheroid to MUC1 aptamers and an efficient internalization in all cells of the spheroids.

Finally, we propose that aptamers may advantageously replace antibodies in diagnostic imaging, where they could specifically detect cancer cells without invasive surgical procedures, or in clinical intraoperative intervention, where they would guide surgeons in removing tumors.

## Materials and Methods

### Aptamer sequences, products, and reagents

The Cy3-5'-labeled-mucin1 DNA aptamer (Cy3-MUC1 aptamer) was purchased from Sigma-Aldrich [5'-GGGAG ACAAGAATAAACGCTCAAGCAGTTGATCCTTTGGA TACCCTGGTTCGACAGGAGGCTCAACAGGC-3']

(dissociation constant,  $K_d$ : 0.135 nM) (Da Pieve et al., 2009)]. An irrelevant Cy3 labeled aptamer was used as control for specificity of labeling (Cy3-control aptamer) (5'-ATGAGA TCTGAGTATAGTGTCCCGCAACCTTACACGAATGACGATTCTAGCGCGGCTGAT-3'). The mouse monoclonal immunoglobulin G (IgG) anti-MUC1 antibody (clone M4H2) was purchased from Abcam ( $K_d < 1.10^{-8}$  M). The rabbit anti-mouse IgG Fab2 Alexa555 and Alexa488-labeled secondary antibodies and calcein-acetoxymethyl ester (calcein-AM) were purchased from Molecular Probes (Life Technologies). Ethidium bromide (BET), D-glucose, magnesium chloride ( $MgCl_2$ ), N-ethylmaleimide (NEM) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich. Washing buffer was prepared by adding 5 mM  $MgCl_2$  and 4.5 g/L glucose into Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS) without calcium and magnesium (Gibco-Invitrogen). The binding buffer was prepared by adding 20 mg/mL BSA to the washing buffer.

### Primary antibody direct labeling

Ten micrograms of M4H2 antibodies were directly labeled in 10- $\mu$ L reaction volume with the Thermo-Scientific DyLight 488 Amine-Reactive Dye (Thermo-Fischer Scientific) for 1 hour at room temperature. Volume was adjusted to 50  $\mu$ L prior to unbound dye removal on an Illustra MicroSpin G-50 column (GE Healthcare Life Science). The stoichiometry of labeling was determined spectrophotometrically at pH 8.5. The protein-bound dye concentrations were calculated using the following extinction coefficient:  $\epsilon_{493\text{ nm}} = 70,000\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$  for Alexa488. Antibody concentration after labeling was calculated using  $\epsilon_{280\text{ nm}} = 210,000\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$  with a previous correction from the absorption of the dye at this wavelength. The degree of labeling was 2.7 moles dye per mole of antibody.

### Cell lines

The cell lines of human origin used in this study, human breast adenocarcinoma (MCF-7) were purchased from American Type Culture Collection. MCF-7 cells were grown and maintained in culture with Eagle's minimum essential medium (Gibco-Invitrogen) with 10% heat inactivated fetal bovine serum (Gibco), penicillin/streptomycin (100 units/mL; Gibco-Invitrogen), L-glutamine (0.58 mg/mL; Eurobio) and human insulin (0.01 mg/mL; Sigma). Cells were maintained at 37°C in a 5%  $CO_2$  atmosphere. All experiments on plated cells were performed along the exponential growth phase. N-ethylmaleimide (NEM) was used at 5 mM during 30 minutes to block endocytosis.

### Preparation of spheroids and labeling with aptamer or antibody

MCF-7 cells ( $2 \times 10^4$ ) were plated out in 96-well ultralow attachment plates (Corning Costar Sigma). After 5 days, spheroids were removed from the plate, placed in a 24-well plate and were rinsed twice in washing buffer (Gibot et al., 2013). For antibody labeling, 500  $\mu$ L of binding solution with 13 nM M4H2 MUC1 antibody were incubated with spheroids at room temperature for 30 minutes, washed twice with washing buffer then incubated with the rabbit anti-mouse secondary Alexa555 or Alexa488 antibody (1/2,000) for 30

minutes. Finally, spheroids were washed three times prior mounting in 1-mm-thick Cover Well™ imaging chamber (Grace Bio-Labs). For living and dead cells staining, spheroids were washed twice and then incubated with 1 µg calcein-AM and 10 µg BET for 30 minutes in 1 mL Dulbecco's PBS at 37°C. For labeling with aptamer, spheroids were washed twice, incubated in 500 µL binding solution with 1 µM (72 nt: 0.02 µg/mL) folded (as described above) Cy3-MUC1 aptamer or Cy3-control aptamer for 5 minutes at room temperature, washed twice again, and mounted in a 1-mm-thick imaging chamber. Amounts of aptamers and antibodies used to obtain comparative fluorescence intensities were determined on 2D cell culture, where no hindrance to the access to MUC1 was present regardless of the ligand (Supplementary Fig. S1; Supplementary figures available online at [www.liebertpub.com/nat](http://www.liebertpub.com/nat)).

#### Spheroids fluorescence macroscopy imaging

Fluorescence imaging was carried out on a fluorescence Macroscope (Leica Microsystems SA) with a 1× objective, equipped with a Cool Snap HQ camera (Roper Scientific, Photometrics). Spheroids were imaged at ×2 and ×4 magnification, by fluorescence using appropriate filters (Alexa488: excitation filter, BP: 480/40 nm, emission filter, BP 527/30 nm (L5 set) ; Alexa555 and Cy3: excitation filter, BP: 560/40nm, emission filter, BP: 630/75 nm (EtmCH/TR set, Chroma Technology Corp.). Images were acquired and stored with Metavue software (Molecular Devices). Image analysis was performed off line using the Image J software (freely available from U.S. National Institutes of Health).

#### Spheroids two-photon microscopy imaging

Two-photon microscopy was carried out with a 7MP upright microscope (Carl Zeiss S.A.S.). A Ti-Sapphire femto-second laser, Chameleon Ultra 2 (Coherent Inc. was used as a laser source at 720 nm. For Alexa-555 and Cy3 observations, the emitted signal was directed into a non-descanned detector (barrier filter 565–610 nm). During experiments, all of the

images were acquired using an ×20/0.95 NA immersion lens. Z-stacks were acquired on the TileScan mode 2×2 with ×0.7 magnification and between 125 and 168 z-planes were taken, spaced 2 µm apart. Each plane consists of an image of 1214 µm by 1214 µm (xy resolution: 0.59 µm/pixel). Image analysis and multidimensional rendering was performed with Imaris Software (Bitplane AG).

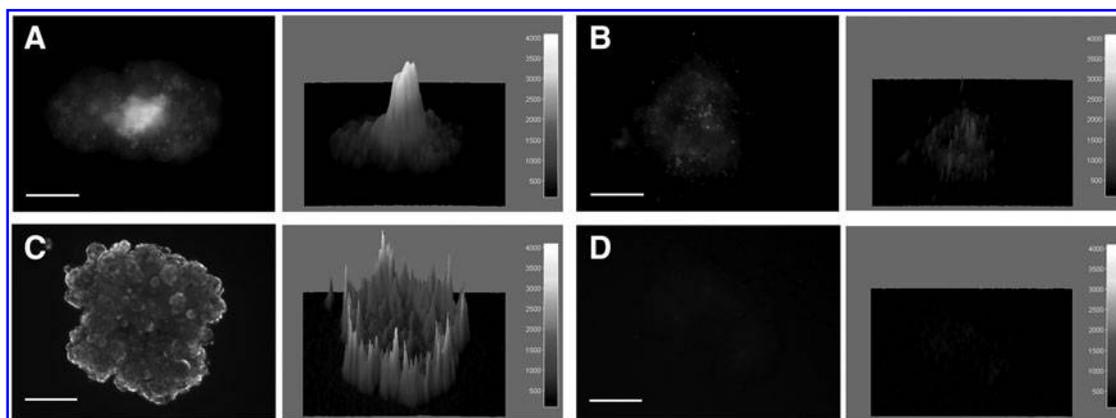
#### Spheroids confocal microscopy imaging

Confocal microscopy was carried out on inverted LSM710 microscope (Carl Zeiss S.A.S.) equipped with the 40× Zeiss objective (1.3 numerical aperture, oil immersion). Dylight488 and Cy3 were visualized using a 488-nm (emission filter: 497–578 nm) and 561-nm laser (emission filter: 565–641 nm) respectively. Eight-bit images were recorded with Zeiss LSM710 software (EMBL). The laser scan was unidirectional. Z-stacks were acquired with ×0.8 and ×3 magnifications spaced 2 µm apart and 1 µm apart respectively and between 34 and 51 z-planes were acquired. Each ×0.8 magnification plane consists of an image of 265 µm by 265 µm (xy resolution: 0.26 µm/pixel) and each ×3 magnification plane consists of an image of 70.7 µm by 70.7 µm (xy resolution: 0.09 µm/pixel).

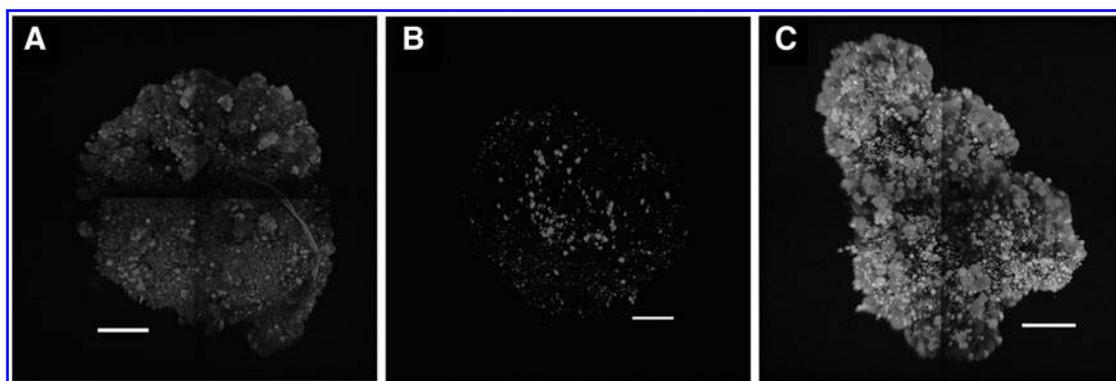
## Results

#### Both aptamer and antibody are effective to detect MUC1 on MCF-7 spheroids

To show whether aptamers may be used as specific and sensitive imaging probes for tumor detection, we analyzed the signal intensity for the MUC1 target expressed in MCF-7 spheroids when detected with Cy3-MUC1 aptamer (MW 22.4 kDa,  $K_d = 0.135$  nM) relative to a specific anti-MUC1 antibody (M4H2) ( $K_d < 10^{-8}$  nM). Cy3-MUC1 aptamer and anti-MUC1 antibody (revealed by an Alexa 555 secondary antibody) were incubated with spheroids and the labeling was analyzed by fluorescence macroscopy (Fig. 1). Cy3-MUC1 aptamer showed a diffuse signal spread all over the spheroid mass with a bell shaped distribution on the spheroid. This is the typical signature of a volumetric distribution of the tagged



**FIG. 1.** Imaging human breast adenocarcinoma (MCF-7) spheroids with mucin1 (MUC1)-specific labeling: Fluorescence macroscopy analysis of Cy3-MUC1 aptamer (A) and MUC1 antibody revealed with an Alexa555 secondary antibody (C) showed that both probes labeled MCF-7 spheroids. No detectable staining was observed with either the irrelevant Cy3-control aptamer (B) or the Alexa555 secondary antibody (D). Spheroids were incubated with 1 µM of aptamers for 5 minutes or with 13 nM of MUC1 antibody for 30 minutes. Scale bars = 200 µm (C); 600 µm (B); 1200 µm (A and D).



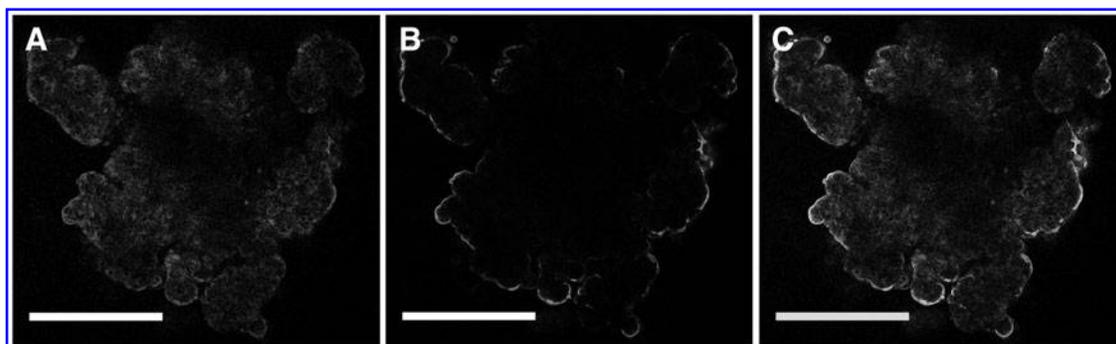
**FIG. 2.** Specific labeling by MUC1 aptamer on MCF-7 spheroids. Z-confocal projections of MCF-7 spheroids labeled with the Cy3-MUC1 aptamer (A), an irrelevant Cy3-control aptamer (B), and a live–dead cell staining with calcein-acetoxymethyl ester and ethidium bromide (C) were performed. The Cy3-MUC1 aptamer exhibits a diffuse labeling all over the spheroid with some focused points (A). The same focused points were observed with an irrelevant Cy3-control aptamer but without diffuse labeling (B). Focused points are due to dead cells as shown by the staining with ethidium bromide (C). Spheroids were incubated with 1  $\mu$ M of aptamers for 5 minutes. Scale bars = 200 $\mu$ m.

aptamer accumulated essentially inside the spheroid (Fig 1A). This detection is illustrative of the specificity of our probe as shown by the nonsignificant weak signal observed in the case of the Cy3-control aptamer that was randomly designed (Fig. 1B). The chemical modification associated to the covalent tagging of the fluorophore is not affecting the selectivity obtained by SELEX. Anti-MUC1 antibody showed a fluorescent signal restricted to the cells that were localized at the periphery of the spheroid (Fig 1C). No labeling was obtained when the secondary Alexa555 antibody was used alone (Fig. 1D) or when no probe was used (Supplementary Fig. S2D).

Image analysis of the labeling by MUC1 aptamer and MUC1 antibody showed that the global fluorescence associated with the spheroid was within the same range for the two probes. The fluorescent yield was indeed 2.5 times higher for the antibody (see Supplementary Data). This comparison was possible because the excitation and the emission of the two fluorophore (Cy3 and Alexa 555) were practically in the same wavelength range. The same results were obtained with all spheroids that were analyzed (Supplementary Fig. 2A, C). To conclude, aptamers were at least as effective as antibodies to image the spheroid.

#### *MUC1 aptamer is specific to detect MUC1 on MCF-7 spheroids*

To assess the specificity of labeling with Cy3-MUC1 aptamer, we compared the labeling of spheroids with the Cy3-MUC1 aptamer (Fig. 2A) and the irrelevant Cy3-control aptamer (Fig. 2B) using fluorescence microscopy. Only a weak nonspecific labeling was observed inside spheroid with discrete localizations (Fig. 2B) compared to the homogeneous pattern obtained with Cy3-MUC1 aptamer (Fig. 2A). It clearly indicated that the specific aptamer labeling had two origins: a nonspecific trapping and a specific interaction with MUC1 target. Dead or necrotic cells were present in the center of spheroids (Wenning and Murphy, 1999), and we hypothesized that the nonspecific labeling observed was due to interaction with genomic DNA released from dead cells. This hypothesis was based on experiments realized on fixed MCF-7 cells, which clearly showed a nuclear labeling with any aptamer (Supplementary Fig. S3). The proportion of living cells and free genomic DNA in our spheroids were checked by using calcein-AM and BET (Fig. 2C). These results confirmed that living cells did not show any BET



**FIG. 3.** A same z-plane confocal exploration shows a penetrating labeling with MUC1-aptamer and a peripheral MUC1-antibody labeling in MCF-7 spheroid. The same spheroid was labeled simultaneously with Cy3-MUC1 aptamer (A) and anti-MUC1 antibody revealed with an Alexa488 secondary antibody (B). The merge image (C) showed colabeling in periphery and a unique aptamer labeling inside the spheroid. Spheroids were incubated with 1  $\mu$ M of aptamers for 5 minutes or with 13 nM of MUC1 antibody for 30 minutes. Scale bars = 200 $\mu$ m.

staining and that the focused spots corresponded to nonspecific labeling. Therefore, the diffuse labeling observed all over the spheroid (Fig. 2A) was due to the specific detection of MUC1 by the Cy3-MUC1 aptamer.

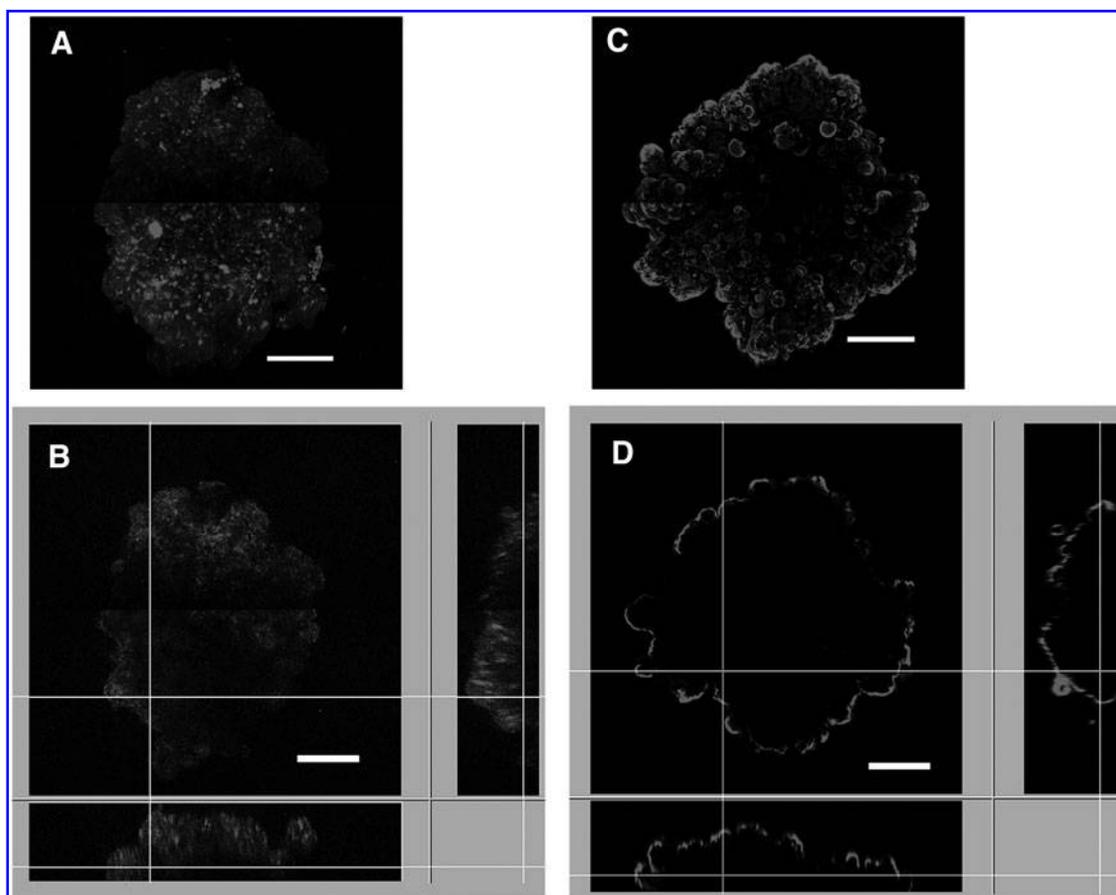
#### *MUC1 aptamer penetrates inside MCF-7 spheroids*

Internal labeling of spheroids by MUC1 aptamers was further investigated by confocal microscopy. Spheroids were simultaneously incubated with Cy3-MUC1 aptamer (Fig. 3A) and anti-MUC1 antibody revealed with an Alexa488 secondary antibody (Fig. 3B). Confocal microscopy allowed a deeper definition inside the spheroid than did fluorescence macroscopy. On the central z-plane image, most of the surface was labeled with Cy3-MUC1 aptamer (Fig. 3A). By contrast, anti-MUC1 antibody only showed a defined labeling of cells located on the periphery of spheroids. No evidence of internal labeling was detected with anti-MUC1 antibody (Fig. 3B).

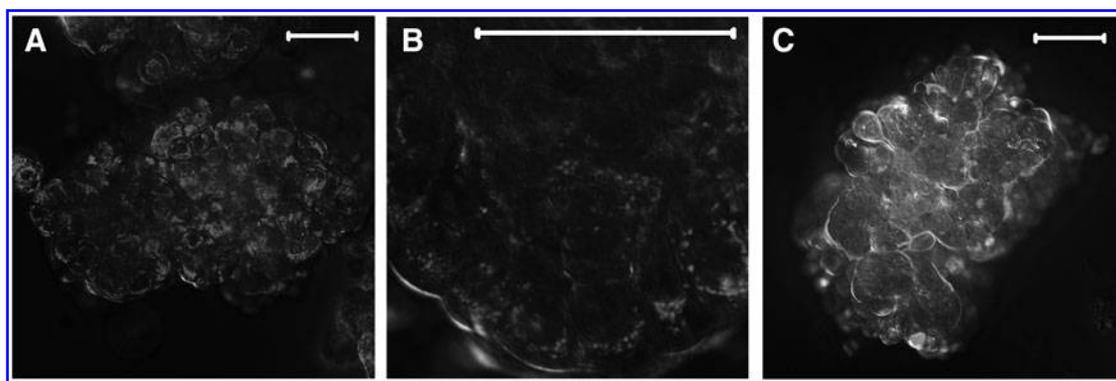
The colocalization of the aptamer and the antibody showed that the cells located at the surface of the spheroid were labeled by the two probes (Fig. 3C). We checked a possible binding competition for the membrane MUC1 antigen between aptamer and antibody and verified that the Alexa488

fluorescence signal was not affected by the cells' absorption in spheroid. Indeed, due to the different wavelength ranges of fluorophores, higher scattering and absorption may contribute to the decrease of the emitted signal of fluorescence from the cells located inside the spheroid. Therefore, we replaced the labeling of the secondary antibody by Alexa555, which had similar excitation/emission wavelengths to Cy3. Cy3-MUC1 aptamer and anti-MUC1 antibody revealed by Alexa555 secondary antibody were added on separated spheroids (Fig. 4A, B). The orthogonal cross sections showed that the labeling obtained with Cy3-MUC1 aptamer and anti-MUC1 antibody revealed by Alexa555 secondary antibody were similar to previous experiments using Alexa488 (Fig. 3B). Analysis with Cy3-MUC1 aptamer labeling showed the uniform and deep labeling of cells inside the spheroid (Fig. 4C). On the other hand, anti-MUC1 antibody again showed exclusively peripheral cell labeling and was not able to bind cells inside the spheroid (Fig. 4D). The comparison between Fig. 4C and 4D on the z-plane cross section clearly confirmed that aptamer had a deeper penetration inside spheroids than antibody, exhibiting a more homogeneous labeling on 3D tumor models.

In all previous experiments, the anti-MUC1 antibody was revealed with a labeled secondary antibody. To verify that the



**FIG. 4.** Z-confocal projections and orthogonal cross sections exploration of spheroid penetrating skills of MUC1-aptamer and MUC1-antibody: z-confocal projection images with Cy3-MUC1 aptamer (A) and anti-MUC1 antibody revealed with Alexa555 secondary antibody (B). The orthogonal cross-sections reveal a good penetration of the Cy3-MUC 1 aptamer (C) and an exclusive peripheral labeling of the anti-MUC1 antibody (D). Spheroids were incubated with 1  $\mu$ M of aptamers for 5 minutes or with 13 nM of MUC1 antibody for 30 minutes. Scale bars = 200  $\mu$ m.



**FIG. 5.** Penetration depth and cellular localization of Cy3-MUC1 aptamer and primary labeled Dylight 488-MUC1 antibody on MCF-7 spheroids. Images corresponded to the overlay of bright field images and fluorescence signals. (A, B) The Cy3-MUC1 aptamer penetrated between the spheroid cells and was internalized. Anti-MUC1 antibody was directly labeled with Dylight 488. (C) Anti-MUC1 antibody did not penetrate inside the spheroid and was not internalized by cells. Spheroids were incubated with 1  $\mu\text{M}$  of aptamers during 5 minutes or with 13 nM of MUC1 antibody for 30 minutes. Scale bars = 50  $\mu\text{m}$ .

poor penetration of anti-MUC1 antibody in the spheroid was not due to a limited accessibility of the secondary antibody, we directly labeled the anti-MUC1 antibody with Dylight 488. MCF-7 spheroids were incubated with Cy3-MUC1 aptamer (Fig. 5A, B) or Dylight 488 anti-MUC1 antibody (Fig. 5C) and then imaged by overlay of phase contrast and fluorescence confocal microscopy. The data confirmed that the antibody only labeled the cells located on the periphery of the spheroid (Fig. 5C) and the absence of internal spheroid labeling. This might be due to the inaccessibility of the primary antibody to its membrane target inside the spheroid. We propose that this is linked to the presence of the extracellular matrix network that prevents the access for large molecules such as antibodies while leaving a free diffusion to the smaller aptamers.

#### *Aptamers are internalized into the cells of spheroids*

Spheroid cells were almost entirely labeled by the Cy3-MUC1 aptamer (Fig. 5A) and the enlargement showed labeling of intracellular vesicles (Fig. 5B), as previously reported (Chang et al., 2011). Moreover, in our conditions, antibody was not internalized into cells and only surfaces of detected cells were labeled. These results demonstrated that in this spheroid model, aptamers, besides their deeper penetration, were internalized inside cell vesicles. To confirm this result, MCF-7 cells were treated with NEM, an inhibitor of endocytosis (Sandvig et al., 2000), before incubation with MUC1 aptamer (Supplementary Fig. S4). Cells treated with NEM lacked the internal labeling observed without NEM incubation.

#### **Discussion**

In this study, we used MCF-7 spheroids as a tumor model to explore the ability of MUC1 aptamer to detect cancer cells and therefore be used as an imaging probe for diagnostic and intraoperative detection of cancer cells. Our major findings showed that aptamers could advantageously replace antibodies. They possess desirable attributes for molecular imaging because they penetrate deeply inside the core of the spheroid, whereas anti-MUC1 antibody only interacts with the cells located on the surface of the spheroid.

Spheroids are 3D cell culture models that have shown their importance in the behavior of biological system culture especially in cancer research. For example, many studies have demonstrated elevated levels of drug resistance in spheroids compared with cell monolayers (Hoffman, 1993). The spheroid model appears to be the best current system for an *ex vivo* model of tumors.

The use of molecular probes that specifically discriminate cancer cells from healthy ones is a powerful tool and represents a considerable progress in tumor diagnosis, as it allows tumors to be precisely circumscribed during intraoperative intervention. Antibodies that recognize a specific biomarker like CEA or epithelial growth factor receptor (EGFR) were used to visualize cancer cells during surgery (Terwisscha van Scheltinga et al., 2011). Up to now, antibodies were considered as the most specific probes for tumor imaging due to their high affinity and specificity (Gao et al., 2004; Cohen and Margel, 2012; Kaur et al., 2012). However, antibodies present two major restrictions for *in vivo* tumor imaging: (1) their immunogenicity, and (2) the difficulty to obtain the chemical modifications needed for fluorescent labeling but also for *in vivo* stability (Worn and Pluckthun, 2001; Jin et al., 2013). Nucleic acid aptamers have emerged as new targeting probes with excellent potential for imaging applications (Cerchia and de Franciscis, 2010; Ruigrok et al., 2011; Zhu et al., 2012). They considerably decrease side effects because of their lack of immunogenicity, and they can easily be chemically modified with, for example, the addition of fluorescent conjugates that allow the specific detection of the target for diagnosis or during surgery.

Here we compared the well-characterized MUC1 aptamer with anti-MUC1 antibody by different fluorescence imaging approaches using spheroids. In our model, cells were detected by MUC1 aptamer all over the spheroid mass, whereas anti-MUC1 antibody showed a labeling limited to the periphery of the spheroid. *In vivo*, enhanced permeability and retention effect (EPR effect) is an important property of solid tumors and clearly increases the penetration of macromolecules (or nanoparticles, liposomes) inside tumors (Maeda, 2001). The leaky vasculature associated with EPR effect of these tumors enhances the spread of macromolecules inside the tumors.

Our results showed that aptamers were more efficient to spread into spheroids than antibodies. The diffuse signal obtained from the aptamers demonstrated their capacity to uniformly infiltrate the tumor mass.

Fluorescence imaging gave convincing results concerning the penetration capacity of aptamers versus antibodies in our spheroid model. As described in the literature (Shigdar et al., 2013), the labeling with antibodies was restricted to the external layer of the spheroid, but their images did not allow an estimation of the depth of aptamer penetration inside the spheroid. Biphotonic microscopy led us to obtain more precise images on this aspect. Z-plane cross sections permitted us to investigate the penetration depth of both aptamers and antibodies inside the spheroid. These observations clearly demonstrated the poor penetration capacity of antibodies and their accumulation on the external layer of the spheroid. The fact that the detection was done with a secondary antibody was addressed and the apparent limited penetration of the primary antibody was also observed when it was directly conjugated with Dylight 488, since only external spheroid layers are labeled. Thus, the information confirmed that the antibody penetration was limited to a few micrometers in depth. In contrast, aptamers showed a continuous labeling across the spheroid.

The observation that antibodies do not penetrate into tumor spheroids was already well-documented (Wenning and Murphy, 1999; Graff and Wittrup, 2003; Thurber and Wittrup, 2008; Shigdar et al., 2013). This limited diffusion was also observed for antibody fragments like scFv (Sutherland et al., 1987) and was mainly explained by the presence of tight junction complexes between adjacent cells that represent a significant barrier to penetration by these proteins. It appears from our results that nucleic acids may bypass these barriers to access the center of the spheroid (Thurber et al., 2007).

This property suggests that aptamers could not only be useful for imaging, but also as delivery tools. Recently, aptamers coupled with toxin (Chu et al., 2006), small interfering RNA (McNamara et al., 2006; Dassie et al., 2009), micro RNA (Dai et al., 2012; Liu et al., 2012) or functionalized nanoparticles (Farokhzad et al., 2006; Yu et al., 2011; Chen et al., 2012) have been shown to be effective in drug-targeting to cancer cells *in vitro* and *in vivo* (Kanwar et al., 2011; Wang and Li, 2011; Li et al., 2013).

Interestingly, the intracellular labeling showed that aptamers were rapidly internalized by intracellular vesicles. We have shown that this labeling was specific for MUC1 aptamer and that an irrelevant aptamer detected only the few dead cells present in spheroids. The same vesicular labeling with anti-MUC1 aptamer conjugated nanoparticles as carrier for doxorubicin was shown to colocalize with late endosomes/lysosomes and to deliver the chemotherapeutic drugs inside the cytoplasm (Chang et al., 2011). This rapid and efficient degradation of the probe in the endocytosis pathway represents a strong possibility to deliver amphipathic drugs inside tumor cells. Recently, results with CD133 aptamer have shown that these probes remain sufficiently long within the tumor mass to efficiently deliver chemotherapeutic drugs (Shigdar et al., 2013).

Using a high resolution imaging approach, our work clearly supports the advantage of small targeting probes like aptamers to efficiently penetrate inside solid tumors.

## Conclusion

Cy3-MUC1 aptamer was able to label cancer cells in a tumor spheroid model. Furthermore, the aptamer penetrated deep into the tumor mass, where it was efficiently internalized inside cell vesicles once the biomarker was detected. This was in contrast to anti-MUC1 antibody, which was confined to the outside of the spheroid.

The small size, the easy chemical modifications and the lack of immunogenicity of aptamers are transforming these molecules as powerful tools that can effectively substitute for antibodies in tumor detection for diagnostics as well as intraoperative image-guided surgery. It is now needed to confirm our results with *in vivo* experiments and to further explore the potential of aptamers as probes to deliver drugs deep inside solid tumors and as theranostic tools.

## Acknowledgments

Financial support for this project was provided by the RITC Foundation of Toulouse (Fondation Recherche et Innovation Thérapeutique en Cancérologie). This project was approved by the Pole de Compétitivité Cancer-Bio-Santé. This work has been performed in collaboration with the Toulouse Réseau Imagerie core of Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) facility (Genotoul, Toulouse, France), which is supported by the Association Recherche Cancer (no. 5585, no. 8505), Région Midi-Pyrénées (CPER), and Grand Toulouse cluster. We thank Michael Shirber for carefully reading the manuscript.

## Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

## References

- BAOUENDI, M., COGNET, J.A., FERREIRA, C.S., MISAILIDIS, S., COUTANT, J., PIOTTO, M., HANTZ, E., and HERVE DU PENHOAT, C. (2012). Solution structure of a truncated anti-MUC1 DNA aptamer determined by mesoscale modeling and NMR. *FEBS J.* **279**, 479–490.
- BELLARD, E., CHABOT, S., ECOCHARD, V., MARTINEZ, O., PAGANIN-GIOANNI, A., PELOFY, S., PAQUEREAU, L., ROLS, M.P., COUDERC, B., TEISSIÉ, J. et al. (2013). Fluorescence imaging in cancerology. *Curr. Mol. Imaging* **2**, 3–17.
- CAI, L., CHEN, Z.Z., CHEN, M.Y., TANG, H.W., and PANG, D.W. (2013). MUC-1 aptamer-conjugated dye-doped silica nanoparticles for MCF-7 cells detection. *Biomaterials* **34**, 371–381.
- CERCHIA, L., and DE FRANCISCIS, V. (2010). Targeting cancer cells with nucleic acid aptamers. *Trends Biotechnol.* **28**, 517–525.
- CHANG, M., YANG, C.S., and HUANG, D.M. (2011). Aptamer-conjugated DNA icosahedral nanoparticles as a carrier of doxorubicin for cancer therapy. *ACS Nano*. **5**, 6156–6163.
- CHARLTON, J., SENNELLO, J., and SMITH, D. (1997). *In vivo* imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase. *Chem. Biol.* **4**, 809–816.
- CHEN, L.Q., XIAO, S.J., HU, P.P., PENG, L., MA, J., LUO, L.F., LI, Y.F., and HUANG, C.Z. (2012). Aptamer-mediated nanoparticle-based protein labeling platform for intracellular imaging and tracking endocytosis dynamics. *Anal. Chem.* **84**, 3099–3110.

- CHU, T.C., MARKS, J.W., 3RD, LAVERY, L.A., FAULKNER, S., ROSENBLUM, M.G., ELLINGTON, A.D., and LEVY, M. (2006). Aptamer:toxin conjugates that specifically target prostate tumor cells. *Cancer Res.* **66**, 5989–5992.
- CIBIEL, A., PESTOURIE, C., and DUCONGE, F. (2012). *In vivo* uses of aptamers selected against cell surface biomarkers for therapy and molecular imaging. *Biochimie* **94**, 1595–1606.
- COHEN, S., and MARGEL, S. (2012). Engineering of near IR fluorescent albumin nanoparticles for *in vivo* detection of colon cancer. *J. Nanobiotechnology* **10**, 36.
- DA PIEVE, C., PERKINS, A.C., and MISSAILIDIS, S. (2009). Anti-MUC1 aptamers: radiolabelling with Tc-99m and biodistribution in MCF-7 tumour-bearing mice. *Nucl. Med. Biol.* **36**, 703–710.
- DAI, F., ZHANG, Y., ZHU, X., SHAN, N., and CHEN, Y. (2012). Anticancer role of MUC1 aptamer-miR-29b chimera in epithelial ovarian carcinoma cells through regulation of PTEN methylation. *Target Oncol.* **7**, 217–225.
- DASSIE, J.P., LIU, X.Y., THOMAS, G.S., WHITAKER, R.M., THIEL, K.W., STOCKDALE, K.R., MEYERHOLZ, D.K., MCCAFFREY, A.P., MCNAMARA, J.O., 2ND, and GIANGRANDE, P.H. (2009). Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nat. Biotechnol.* **27**, 839–849.
- FAROKHZAD, O.C., CHENG, J., TEPLY, B.A., SHERIFI, I., JON, S., KANTOFF, P.W., RICHIE, J.P., and LANGER, R. (2006). Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 6315–6320.
- FERREIRA, C.S., MATTHEWS, C.S., and MISSAILIDIS, S. (2006). DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers. *Tumour Biol.* **27**, 289–301.
- GAO, X., CUI, Y., LEVENSON, R.M., CHUNG, L.W., and NIE, S. (2004). *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **22**, 969–976.
- GIBOT, L., and ROLS, M.P. (2013). Progress and prospects: the use of 3D spheroid model as a relevant way to study and optimize DNA electrotransfer. *Curr. Gene Ther.* **13**, 175–181.
- GIBOT, L., WASUNGU, L., TEISSIE, J., and ROLS, M.P. (2013). Antitumor drug delivery in multicellular spheroids by electroporation. *J. Control. Release* **167**, 138–147.
- GRAFF, C.P., and WITTRUP, K.D. (2003). Theoretical analysis of antibody targeting of tumor spheroids: importance of dosage for penetration, and affinity for retention. *Cancer Res.* **63**, 1288–1296.
- HOFFMAN, R.M. (1993). To do tissue culture in two or three dimensions? That is the question. *Stem Cells* **11**, 105–111.
- HORM, T.M., and SCHROEDER, J.A. (2013). MUC1 and metastatic cancer: Expression, function and therapeutic targeting. *Cell Adh. Migr.* **7**, 187–198.
- HU, Y., DUAN, J., ZHAN, Q., WANG, F., LU, X., and YANG, X.-D. (2012). Novel MUC1 aptamer selectively delivers cytotoxic agent to cancer cells *in vitro*. *Plos One* **7**, e31970.
- JIN, E., ZHANG, B., SUN, X., ZHOU, Z., MA, X., SUN, Q., TANG, J., SHEN, Y., VAN KIRK, E., MURDOCH, W.J. et al. (2013). Acid-active cell-penetrating peptides for *in vivo* tumor-targeted drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 933–940.
- KANWAR, J.R., ROY, K., and KANWAR, R.K. (2011). Chimeric aptamers in cancer cell-targeted drug delivery. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**, 459–477.
- KAUR, S., VENKTARAMAN, G., JAIN, M., SENAPATI, S., GARG, P.K., and BATRA, S.K. (2012). Recent trends in antibody-based oncologic imaging. *Cancer Lett.* **315**, 97–111.
- KAUSHAL, S., MCELROY, M.K., LUIKEN, G.A., TALAMINI, M.A., MOOSSA, A.R., HOFFMAN, R.M., and BOUVET, M. (2008). Fluorophore-conjugated anti-CEA antibody for the intraoperative imaging of pancreatic and colorectal cancer. *J. Gastrointest. Surg.* **12**, 1938–1950.
- KIM, J.K., CHOI, K.J., LEE, M., JO, M.H., and KIM, S. (2012). Molecular imaging of a cancer-targeting theragnostics probe using a nucleolin aptamer- and microRNA-221 molecular beacon-conjugated nanoparticle. *Biomaterials* **33**, 207–217.
- KUROSAKI, T., HIGUCHI, N., KAWAKAMI, S., HIGUCHI, Y., NAKAMURA, T., KITAHARA, T., HASHIDA, M., and SASAKI, H. (2012). Self-assemble gene delivery system for molecular targeting using nucleic acid aptamer. *Gene* **491**, 205–209.
- LI, X., ZHAO, Q., and QIU, L. (2013). Smart ligand: aptamer-mediated targeted delivery of chemotherapeutic drugs and siRNA for cancer therapy. *J. Control. Release* **171**, 152–162.
- LIU, N., ZHOU, C., ZHAO, J., and CHEN, Y. (2012). Reversal of paclitaxel resistance in epithelial ovarian carcinoma cells by a MUC1 aptamer-let-7i chimera. *Cancer Invest.* **30**, 577–582.
- MAEDA, H. (2001). The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **41**, 189–207.
- MAYER, G. (2009). The chemical biology of aptamers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 2672–2689.
- MCELROY, M., KAUSHAL, S., LUIKEN, G.A., TALAMINI, M.A., MOOSSA, A.R., HOFFMAN, R.M., and BOUVET, M. (2008). Imaging of primary and metastatic pancreatic cancer using a fluorophore-conjugated anti-CA19-9 antibody for surgical navigation. *World J. Surg.* **32**, 1057–1066.
- MCNAMARA, J.O., 2ND, ANDRECHEK, E.R., WANG, Y., VILES, K.D., REMPEL, R.E., GILBOA, E., SULLENGER, B.A., and GIANGRANDE, P.H. (2006). Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1005–1015.
- ORAVA, E.W., CICMIL, N., and GARIEPY, J. (2010). Delivering cargoes into cancer cells using DNA aptamers targeting internalized surface portals. *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 2190–2200.
- RUIGROK, V.J., LEVISSON, M., EPPINK, M.H., SMIDT, H., and VAN DER OOST, J. (2011). Alternative affinity tools: more attractive than antibodies? *Biochem. J.* **436**, 1–13.
- SANDVIG, K., LLORENTE, A., RODAL, S.K., EKER, P., GARRED, O., STAHLHUT, M., VAN DEURS, B. (2000). Apical macropinocytosis in polarized MDCK cells: regulation by N-ethylmaleimide-sensitive proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 447–457.
- SHI, H., HE, X.X., WANG, K.M., WU, X., YE, X.S., GUO, Q.P., TAN, W.H., QING, Z.H., YANG, X.H., and ZHOU, B. (2011). Activatable aptamer probe for contrast-enhanced *in vivo* cancer imaging based on cell membrane protein-triggered conformation alteration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 3900–3905.
- SHIGDAR, S., QIAO, L., ZHOU, S.F., XIANG, D., WANG, T., LI, Y., LIM, L.Y., KONG, L., LI, L., and DUAN, W. (2013). RNA aptamers targeting cancer stem cell marker CD133. *Cancer Lett.* **330**, 84–95.
- SUTHERLAND, R., BUCHEGGER, F., SCHREYER, M., VACCA, A., and MACH, J.P. (1987). Penetration and binding of radiolabeled anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies and their antigen binding fragments in human colon multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* **47**, 1627–1633.

- TERWISSCHA VAN SCHELTINGA, A.G., VAN DAM, G.M., NAGENGAST, W.B., NTZIACHRISTOS, V., HOLLEMA, H., HEREK, J.L., SCHRODER, C.P., KOSTERINK, J.G., LUB-DE HOOG, M.N., and DE VRIES, E.G. (2011). Intraoperative near-infrared fluorescence tumor imaging with vascular endothelial growth factor and human epidermal growth factor receptor 2 targeting antibodies. *J. Nucl. Med.* **52**, 1778–1785.
- THURBER, G.M., and WITTRUP, K.D. (2008). Quantitative spatiotemporal analysis of antibody fragment diffusion and endocytic consumption in tumor spheroids. *Cancer Res.* **68**, 3334–3341.
- THURBER, G.M., ZAJIC, S.C., and WITTRUP, K.D. (2007). Theoretic criteria for antibody penetration into solid tumors and micrometastases. *J. Nucl. Med.* **48**, 995–999.
- WANG, J., and LI, G. (2011). Aptamers against cell surface receptors: selection, modification and application. *Curr. Med. Chem.* **18**, 4107–4116.
- WENNING, L.A., and MURPHY, R.M. (1999). Coupled cellular trafficking and diffusional limitations in delivery of immunotoxins to multicell tumor spheroids. *Biotechnol. Bioeng.* **62**, 562–575.
- WORN, A., and PLUCKTHUN, A. (2001). Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J. Mol. Biol.* **305**, 989–1010.
- WU, P., GAO, Y., ZHANG, H., and CAI, C. (2012). Aptamer-guided silver-gold bimetallic nanostructures with highly active surface-enhanced Raman scattering for specific detection and near-infrared photothermal therapy of human breast cancer cells. *Anal. Chem.* **84**, 7692–7699.
- YU, C., HU, Y., DUAN, J., YUAN, W., WANG, C., XU, H., and YANG, X.-D. (2011). Novel aptamer-nanoparticle bioconjugates enhances delivery of anticancer drug to MUC1-positive cancer cells *in vitro*. *Plos One* **6**, e24077.
- ZHU, G.Z., YE, M., DONOVAN, M.J., SONG, E.Q., ZHAO, Z.L., and TAN, W.H. (2012). Nucleic acid aptamers: an emerging frontier in cancer therapy. *Chem. Commun.* **48**, 10472–10480.

Address correspondence to:

*Laurent Paquereau, PhD*

*Centre National de la Recherche Scientifique, CNRS*

*205 Route de Narbonne*

*Toulouse 31077*

*France*

*E-mail: laurent.paquereau@ipbs.fr*

Received for publication August 2, 2013; received after revision December 30, 2013.

## Supplementary Data

### Fluorescence Analysis

The intensity of the fluorescence detected on spheroids is represented by the equation:

$$I_f = k \times n \times I_0 \times \epsilon \times \phi$$

Where

$I_f$  is the intensity of fluorescence,  
 $k$  the constant of the apparatus,  
 $n$  the number of the molecules detected,  
 $I_0$  the intensity of the fluorophore,  
 $\epsilon$  the molar extinction coefficient, and  
 $\Phi$  is the quantum yield of the fluorophore.

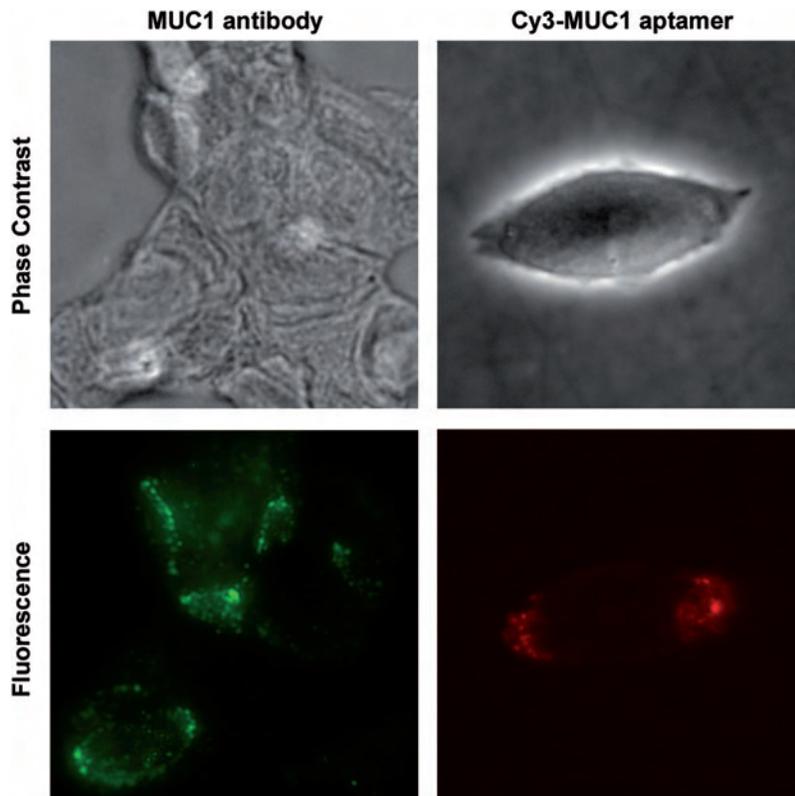
As we are using a fluorescent microscope,  $I_f$  is dependent on the size of the spheroid.

$I_f$  is highly similar for Cy3MUC1 aptamer and Alexa555-MUC1 antibody (Fig.1). As in each case the product of  $k \times I_0$  is equivalent (same imaging system), we got for  $\epsilon \times \Phi$ :  $0.10 \times 150,000 = 15,000$  with the antibody, and  $0.04 \times 15,000 = 6,000$  for the aptamer.

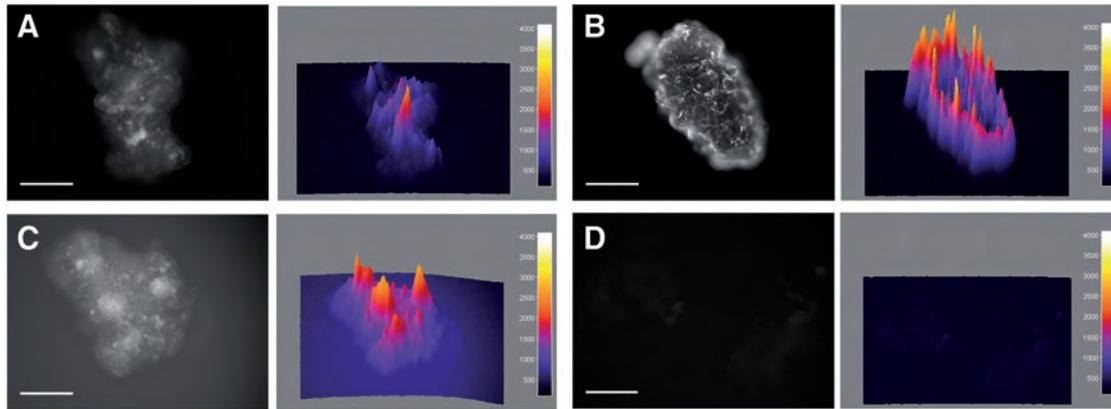
### Supplementary Materials and Methods: Plated Cells Microscopy

Twenty-four hours prior to labeling, cells were seeded at a density of 30% in a two-chamber Lab-tek 2 coverglass sys-

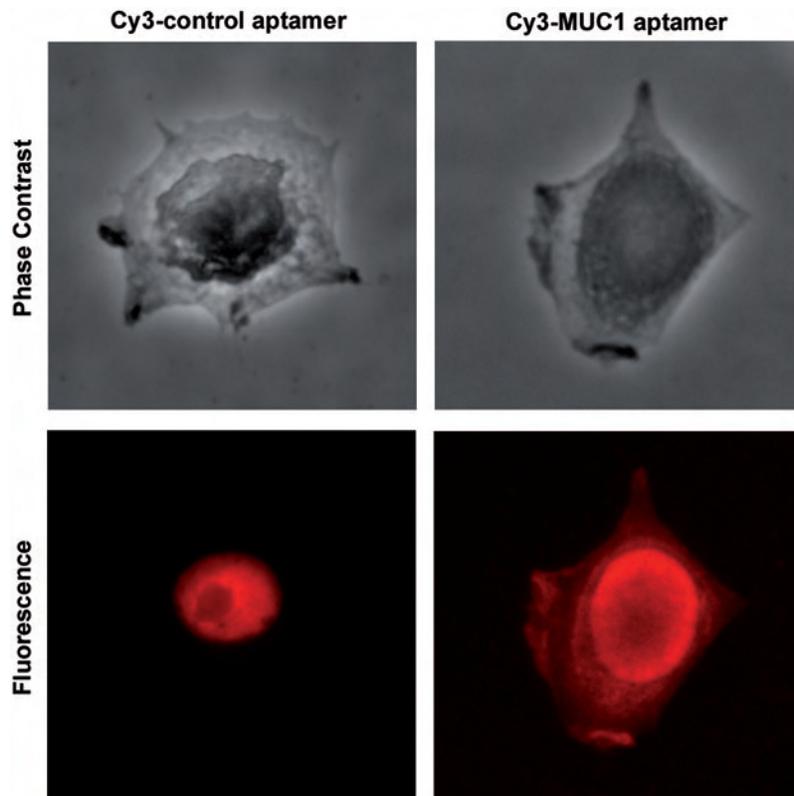
tem (Nunc) in culture growth medium. Before incubation with aptamers or antibodies, chambers were washed twice with 2 mL washing buffer after culture medium removal. Aptamers at 2  $\mu$ M were diluted in 250  $\mu$ L washing buffer without glucose and denatured at 95°C for 5 minutes, folded at room temperature for 10 minutes, and 250  $\mu$ L washing buffer with 4 % bovine serum albumin and 9 g/L glucose were added to obtain 500  $\mu$ L of 1  $\mu$ M aptamer binding solution. After two 5-minute washes, the 5-minute aptamer incubation is completed. For antibody labeling, cells were blocked for 1 hour in washing buffer supplemented with 10% fetal bovine serum. After three 10-minute washes, cells were incubated with 13 nM M4H2 primary antibody in 500  $\mu$ L binding buffer for 30 minutes. Three 10-minute washes were performed before the 1-hour incubation with the Alexa488 secondary antibody (1/2,000). For both aptamer and antibody labeling, two washes were done before the chamber was placed on the stage of an inverted digitized microscope (Leica DMIRB). Cells were observed with a Leica 40 $\times$ , 1.3 numerical aperture (NA) objective. The wavelengths were selected by using the Leica N1 filter block for the Alexa488-coupled antibody and the Leica mCherry filter block for the cyanine3-conjugated aptamer. Images were recorded with the Metamorph software (Molecular Devices) equipped with a Photometrics cooled CoolSNAP HQ2 CCD camera (Roper Scientific).



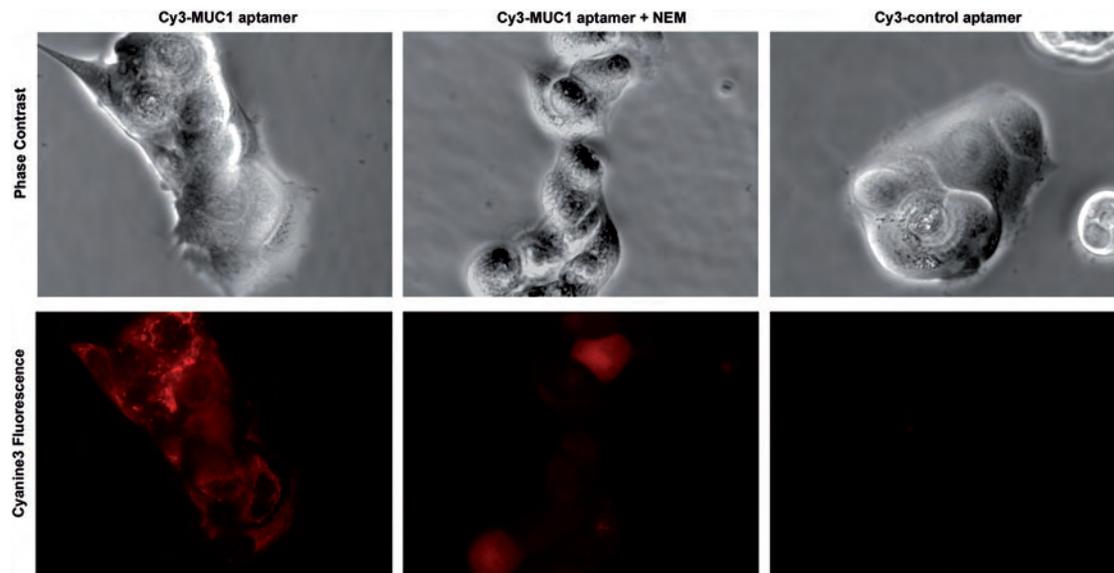
**SUPPLEMENTARY FIG. S1.** Imaging MCF-7 (human breast adenocarcinoma) living cells with MUC1 specific labeling: Cy3-MUC1 aptamer and MUC1 antibody revealed with an Alexa488 secondary antibody imaging by phase contrast and by fluorescence microscopy. Plated cells were incubated with 1  $\mu$ M of aptamers during 5 minutes or with 13 nM of MUC1 antibody during 30 minutes. Fluorescence intensities were normalized on fluorescence images.



**SUPPLEMENTARY FIG. S2.** Fluorescence macroscopy imaging of MCF-7 spheroids with mucin1 (MUC1)-specific labeling: Cy3-MUC1 aptamer (A, B) and MUC1 antibody revealed with an Alexa488 secondary antibody (C) both labeled MCF-7 spheroids. No detectable staining was observed in the control without aptamer or antibody (D). Spheroids were incubated with 1  $\mu$ M of aptamers for 5 minutes or with 13 nM of MUC1 antibody for 30 minutes. Scale bars = 200 $\mu$ m.



**SUPPLEMENTARY FIG. S3.** Imaging MCF-7 fixed cells with Cy3-MUC1 and an irrelevant Cy3-control aptamer. A nuclear labeling is observed with any aptamer. Plated cells were incubated with 1  $\mu$ M of aptamers for 5 minutes.



**SUPPLEMENTARY FIG. S4.** MCF-7 living cells treated with or without N-ethylmaleimide (NEM) before incubation with Cy3-MUC1 aptamer or Cy3-control aptamer. No specific internalization of Cy-3 MUC1 aptamer was observed with the inhibitor of endocytosis. Plated cells were incubated with 1  $\mu$ M of aptamers for 5 minutes.

# Méthodologie

---

## 1 Lignées Cellulaires :

La lignée cellulaire NIH:OVCAR3 provient de l'ATCC, la lignée SK-OV-3 nous a été fournie par l'équipe du Pr Querleu (Institut Claudius Régaud – Toulouse), les lignées B16-F10 et ZR-75-1 par l'équipe du Dr Muller (IPBS – Toulouse).

## 2 CE-SELEX IL-8 :

225 pmoles de librairie<sup>2</sup> marquée à la fluorescéine en 5' (5'*FamTGGGCACTATTTATATCAAC-25N-AATGTCGTTGGTGGCCC*) ont été chauffées 5 minutes à 95°C dans 9 µL de tampon de liaison (50 mM Tris Acétate pH 8,2 ; 5 mM MgCl<sub>2</sub>), placé 4 minutes dans la glace puis à température ambiante pendant 20 minutes. 1 µL d'IL-8 à 10 µM a été rajouté pour l'interaction de 20 minutes à température ambiante). L'appareil utilisé est un PA800 Beckman-Coulter équipé d'un détecteur UV barette de diode et d'un détecteur LIF monté avec un capillaire de silice de 75 µm de diamètre interne, 80 cm de longueur totale et 70 cm au détecteur (*Polymicro*, USA). La migration se fait à 30 kV dans du tampon de migration Tris-Acétate 50 mM à pH 8,2. Le volume des échantillons à injecter est de 10 µL. Chaque injection dure 13 secondes sous une pression de 2 psi. Une petite quantité de l'interaction est injectée puis des fractions sont collectées. 1 µL d'IL-8 à 10 µM est rajouté à 9 µL de la fraction collectée d'intérêt puis l'interaction est laissée 20 minutes à température ambiante avant injection. Ceci a été répété lors d'un troisième cycle de non-SELEX. Les séquences de la fraction 3.3E1.3 contenant les pics de complexe de la troisième interaction ont été amplifiées 25 cycles par PCR dans 5 tubes de 50 µLensemencés au 1/10<sup>ème</sup>. Une amorce « anti-sens » contenant deux terminateurs TEG et une extrémité 5' polythymidine (5'*TTTTTTTTTTTTTTTTTT-TEG-TEG-GGGCCACCAACGACATT*) a été utilisée pour générer des brins « antisens » plus longs que les brins « sens ». Les produits PCR ont été dénaturés par chauffage dans une solution de formamide puis déposés sur gel SDS-PAGE 15% dénaturant (8 M urée), la bande « sens » découpée et l'ADNsb purifié à l'aide d'un kit DNA Gel Extraction (Millipore). Les séquences ADNsb « sens » marquées ont été foldées puis injectées et leur temps de migration contrôlé. Puis une concentration finale de 100 nM d'IL-8 a été mise à interagir avec les séquences pendant 20 minutes à

température ambiante avant injection du mélange. Les séquences du pic collecté ont été clonées d'après le protocole de clonage décrit en section Méthodologie-6.1 et envoyées à séquencer.

### 3 Sélection d'Aptamères par Filter-Binding SELEX :

Le tampon d'interaction utilisé est composé de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9 mM pH 8; 40 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 1 mM MgCl<sub>2</sub>. 25 pmoles de librairie<sup>2</sup> marquée à la fluorescéine en 5' préparée dans le tampon de liaison a été préstructurée comme défini précédemment. Un filtre de nitrocellulose 0,45 µm HAWP01300 (Millipore) a été traité par incubation 40 minutes dans une solution de KOH 0,5 N puis rincé à l'eau MilliQ et placé dans un tampon phosphate 0,5 M pH 8 puis rincé avec du tampon de liaison. La librairie est incubée 15 minutes en présence de morceaux de filtres traités pour la contre-sélection. Le surnageant est ensuite incubé 30 minutes à température ambiante en présence de 200 nM d'IL-8 dans un volume final de 500 µL. La solution d'interaction est filtrée puis 3 lavages avec 300 µL de tampon de liaison sont effectués. Le filtre est ensuite découpé, placé dans un eppendorf avec 100 µL d'eau MilliQ et chauffé 5 minutes à 95°C. Le surnageant est prélevé puis utilisé pour ensemer 10 tubes PCR de 50 µL au 1/25<sup>ème</sup> avec une amorce « antisens » contenant deux terminateurs PEG et une queue polythymidine (voir précédemment). 25 cycles sont effectués et le produit PCR contrôlé sur gel d'agarose 2%. Les ADNsb « sens » sont purifiés comme décrit précédemment en section III-2. 25 pmoles de sous-librairie sont utilisés à chaque cycle pour l'interaction. Les concentrations d'IL-8 sont progressivement réduites : 200 nM au cycle<sup>2</sup>, 50 nM aux cycles<sup>3</sup> et 4, et 5 nM dans les cycles suivants. Le temps d'interaction est réduit à 15 minutes à partir du cycle<sup>6</sup>.

### 4 Sélection d'Aptamères par Cell-SELEX :

Le tampon de lavage est du Dulbecco's PBS (DPBS) à pH 7.4 avec 4,5 g/L de D-Glucose et ajusté à 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Le tampon de liaison a la même composition

que le tampon de lavage avec l'addition de 1 mg/mL d'albumine sérique bovine (BSA) et de 0,1 mg/mL d'ARNt de *Torula*. Lors du premier cycle de Cell-SELEX, 5 mL de DPBS ; 5 mM MgCl<sub>2</sub> contenant 2 nmoles de la librairie5 (5'FamCGCCTCGGATAACGGATT-25N-TTCGCAGGTTACAGGACA) naïve ont été chauffées à 95°C pendant 10 minutes puis placées dans de la glace pendant 10 minutes. La BSA, les ARNt et le D-Glucose sont alors ajoutés dans la solution d'interaction froide avant son retour à température ambiante. La librairie structurée est incubée avec les cellules NIH:OVCAR3 à 80% de confluence dans une flasque de culture de 75 cm<sup>2</sup> pendant 30 minutes sous agitation légère et à température ambiante. La solution de liaison est prélevée (fraction de séquences Non Retenues) et les cellules sont lavées deux fois sous agitation légère et à température ambiante dans 5 mL de tampon de lavage pendant 15 minutes puis 1 mL pendant 5 minutes. Les cellules sont grattées à l'aide d'un cell scraper dans 500 µL de tampon de lavage, la solution est chauffée 10 minutes à 95°C, rapidement centrifugée puis le surnageant contenant les séquences éluées est prélevé. Les concentrations en séquences dans les fractions Non-Retenue, les 2 lavages et l'extrait sont évalués par spectrofluorimétrie. Un échantillon d'ADN élué est amplifié en PCR suivant le protocole de PCR en cascade décrit en section III-5 avec une amorce « sens » marquée à la fluorescéine en 5' et une amorce « antisens » biotinylée en 5'. Les 2,5 mL de produits ADNdb sont mis à incuber avec 150 µL de billes recouvertes de streptavidine (Pierce) pendant 2h sur roue tournante à température ambiante. Les billes sont ensuite placées dans une colonne de centrifugation 0,8 mL (Pierce). La colonne est rincée 2 fois par 500 µL de DPBS. L'éluat s'effectue par 200 µL de NaOH 0,2 M placés sur la colonne et conservés 5 minutes avant d'être poussés à la seringue. 3 éluats successives sont ainsi réalisées. Chaque éluat est immédiatement tamponné par 50 µL de Tris-HCl 1 M pH 7,5. Les éluats sont ensuite mis à précipiter sur la nuit à -80°C après ajout de 1/10<sup>ème</sup> de volume de Na Acétate 3M ; 5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 5,2 puis de 3 volumes d'éthanol 96%. Après 30 minutes de centrifugation à 9000 g, les précipités sont repris dans 50 µL de DPBS et dosés au nanodrop. 200 pmol d'ADNsb seront utilisées lors du cycle suivant de Cell-SELEX. La taille des flasques de culture, les volumes et les temps d'incubation et de lavages ont été modifiés au cours des cycles pour augmenter la spécificité des séquences d'après les données de la **Figure 30**. Des contre-sélections sur les cellules SK-OV-3 ont également été effectuées à

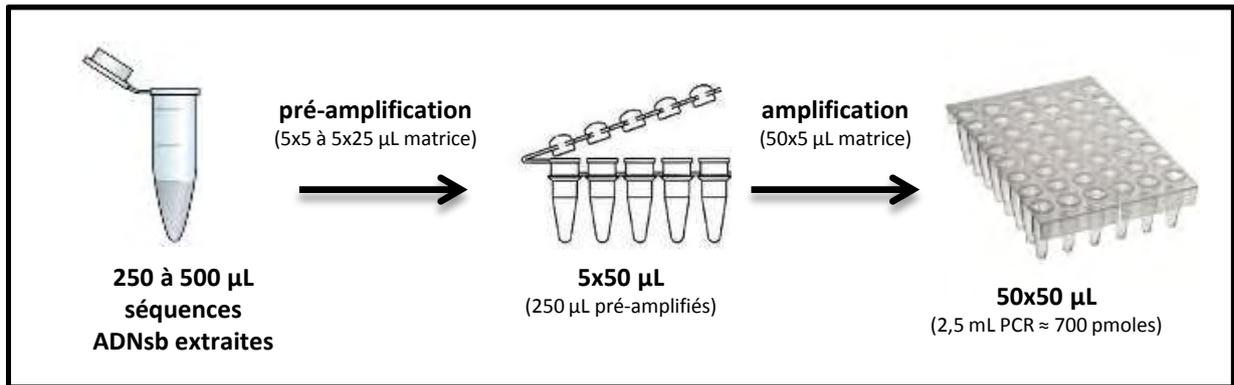
certaines cycles avant l'incubation avec les cellules cibles comme indiqué en **Figure 30**.

## 5 PCR en Cascade :

Lors de SELEX, il est classiquement observé l'apparition de produits PCR de taille supérieure à la taille attendue. Il semble impératif d'éviter au maximum l'apparition de ces amplicons qui ne correspondent pas aux séquences originelles de la librairie et donc aux séquences sélectionnées pour leur capacité de liaison à la cible.

La génération de tels produits est corrélée à une trop grande concentration de produits PCR dans le tube conduisant à l'hybridation intermoléculaire de séquences de la librairie. Ceci est en général observé à partir d'une concentration supérieure à 20 ng/ $\mu$ L, c'est donc la concentration critique à éviter de dépasser (Tuerk & Gold 1990; Bell & DeMarini 1991). Or comme indiqué précédemment, il nous faut produire une grande quantité de produits PCR à chaque cycle afin de purifier suffisamment d'ADNsb pour procéder au cycle suivant de SELEX.

Afin de générer autant de produit PCR à partir d'une faible concentration d'ADNsb issus de la sélection, l'approche développée classiquement par l'équipe de Weihong Tan consiste en la réalisation de deux PCR successives (pré-amplification et amplification), la seconde utilisant une dilution de la première comme matrice. Cette « double » PCR permet de réduire la concentration en produit PCR dans le tube et donc de retarder l'apparition de produits non souhaités tout en permettant l'obtention d'un plus grand volume. Nous réalisons 5 PCR de pré-amplification avec comme matrice les ADNsb sélectionnés et élués de la molécule cible puis utilisons ces produits pour ensemercer au  $1/10^{\text{ème}}$  50 tubes dits d'amplification PCR (**Figure 59**).

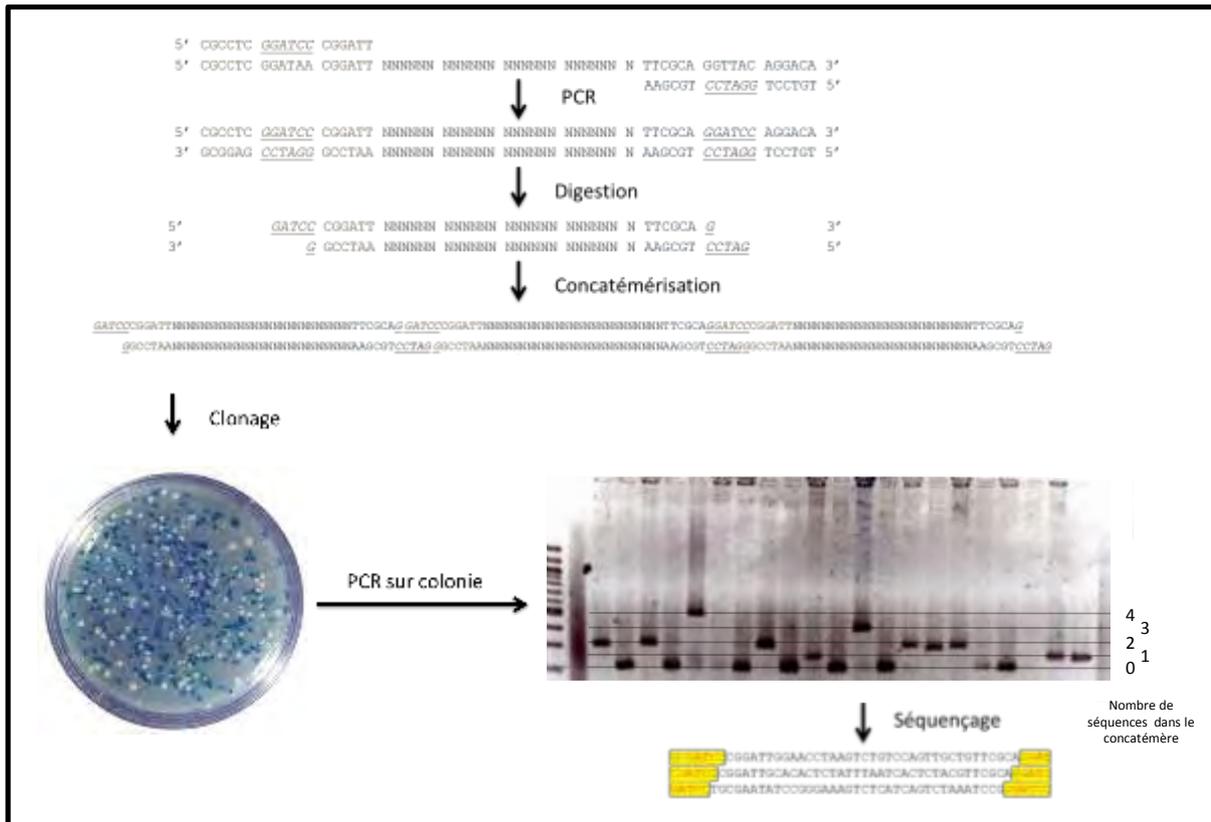


**Figure 59 : PCR en cascade.** 25 à 125  $\mu\text{L}$  du volume de séquences extraites servent à ensemercer les 250  $\mu\text{L}$  de PCR de pré-amplification. Ces 250  $\mu\text{L}$  servent ensuite à ensemercer 2,5 mL de PCR d'amplification.

## 6 Identification des Séquences :

### 6.1 Clonage :

Afin de rentabiliser au maximum l'approche clonage, les séquences d'un cycle ont été concatémérisées avant leur insertion dans le plasmide de clonage (**Figure 60**). Des PCR sur colonies ont permis d'identifier les clones présentant un concatémère, les plus grands ont été sélectionnés pour le séquençage. Les amorces utilisées pour l'obtention de produits PCR à cloner sont modifiées de manière à contenir un site de restriction BamHI en leur cœur. Les produits PCR sont ensuite digérés par l'enzyme BamHI puis purifiés sur gel natif (élimination des extrémités digérées). Les produits digérés et purifiés sont ensuite concatémérisés puis clonés dans un plasmide pBluescript ouvert au site BamHI. Des PCR sur colonies par utilisation d'amorces encadrant le site de clonage permettent de déterminer avec certitude la présence d'un insert et le nombre de séquences comprises dans le concatémère. Grâce à cette méthode, nous avons obtenu à titre d'exemple 34 séquences en 11 clones pour le cycle 15 du Cell-SELEX.



**Figure 60 : Clonage BamHI des séquences par concatémérisation.** Des PCR avec les amorces modifiées permettent d'incorporer un site BamHI de part et d'autre de la séquence dégénérée. Après digestion, les produits sont concatémérisés puis clonés. Des PCR sur colonies permettent d'envoyer à séquencer les plasmides contenant un maximum de séquences.

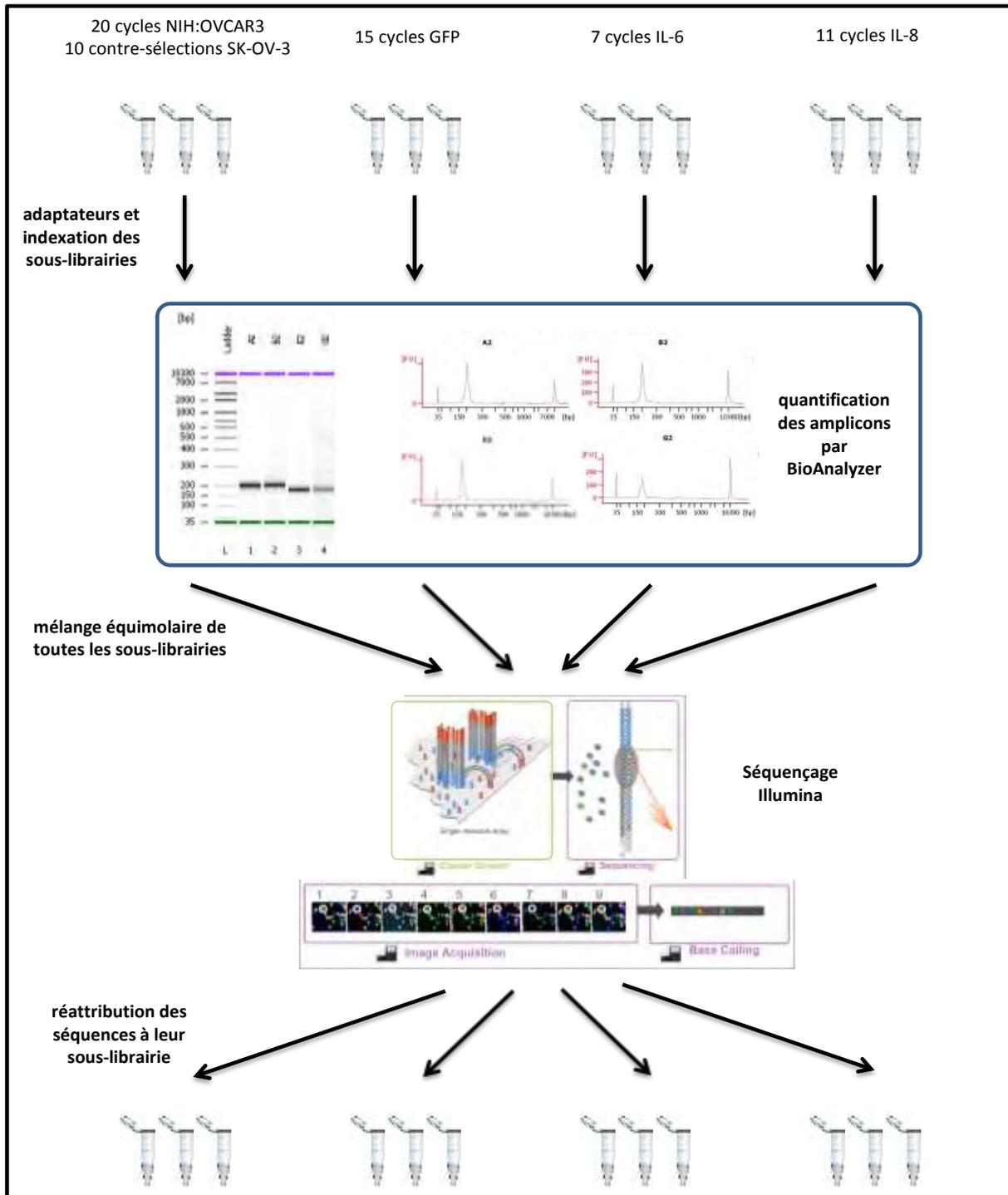
## 6.2 Séquençage haut-débit Illumina :

Pour rentabiliser l'approche Illumina, nous avons souhaité ne procéder qu'à un seul *run* de séquençage regroupant l'ensemble des cycles de quatre SELEX différents effectués au laboratoire. Pour cela, nous avons procédé au marquage des séquences par un INDEX correspondant à un cycle afin de réattribuer les séquences une fois poolées pour le run de séquençage (**Figure 61**).

Nous avons adapté le protocole Illumina afin de séquencer simultanément les cycles de sélection et de contre-sélection de 4 SELEX réalisés. Soit un total de 63 cycles différents. Nous avons utilisé 63 amorces comprenant un index différent pour préparer les séquences d'ADNdb pour le séquençage Illumina.

63 PCR avec 63 amorces comportant un index différent ont été nécessaires pour séquencer 7 cycles contre l'IL-6, 11 cycles contre l'IL-8, les 20 cycles de sélection et les 10 cycles de contre-sélection du Cell-SELEX ainsi que 15 cycles de SELEX effectués auparavant dans le laboratoire contre la GFP.

Les produits PCR ont été purifiés, quantifiés et rassemblés en un mélange équimolaire de chaque index pour le séquençage. Le séquençage a été réalisé sur un appareil MiSeq en collaboration avec la plateforme Génome et Transcriptome (GeT - Génopôle de Toulouse). Les sous-librairies ont été reconstituées *via* l'indexation par la plateforme de bio-informatique du Génopôle de Toulouse.



**Figure 61 : Préparation des sous-librairies, séquençage Illumina et reconstitution des sous-librairies.** Des PCR ont été réalisées sur chaque sous-librairie pour incorporer les adaptateurs indexés. Les produits PCR double-brin ont été purifiés et dosés avant d'être rassemblés dans un mélange équimolaire pour le séquençage sur puce Illumina. Les 11 millions de séquences obtenues ont été rassemblées par index afin de reconstituer les sous-librairies correspondant à chacun des cycles de chacun des SELEX.

On observe des disparités dans le nombre de séquences réattribuées pour chaque sous-librairie (**Figure 62**). De plus, sur les 63 sous-librairies séquencées, 7 présentent moins de 1 000 séquences après reconstitution. Nous avons choisi par la suite d'exclure ces cycles de nos analyses. Les disparités peuvent s'expliquer par l'approximation du dosage et de la purification effectuée avant le séquençage. Cependant nous n'avons pas d'explication pour l'absence de séquences correspondant à certaines sous-librairies.

n° cycle SELEX	nombre de séquences NIH:OVCAR3	nombre de séquences SK-OV-3	nombre de séquences IL-8	nombre de séquences IL-6	nombre de séquences GFP
1	230		64203	0	76340
2	80088		0	88695	50161
3	60005	46898	35397	117208	107852
4	79459		100936	13501	88071
5	35483		54085	85125	82456
6	194010	92244	45370	118757	84836
7	69884		245217	37422	104167
8	51561		62728		82704
9	31	33355	52546		58009
10	136430		0		110182
11	67404		276340		186242
12	52929	271			54780
13	317677				77400
14	227090				152327
15	51980	69			61081
16	144983	69750			
17	123021	57028			
18	225724	372207			
19	216699	18415			
20	51342	29886			

**Figure 62 : Détails du nombre de séquences obtenues après le séquençage Illumina contre chaque cible. Les séquences SK-OV-3 sont issues du séquençage des séquences contre-sélectionnées lors du Cell-SELEX.**

## 7 Analyse des Séquences

Le traitement informatique et automatisé de séquences tel que la recherche de motifs doit être validé par une analyse manuelle afin de vérifier que les informations obtenues de manière automatisée correspondent à la réalité observée de manière directe. Le traitement initial des séquences est commun aux deux méthodes. Les sous-librairies reconstituées sont traitées de manière à ne conserver que les parties dégénérées (Figure 63-2 et -3) en éliminant les adaptateurs Illumina et les parties fixes des librairies. Puis les séquences dégénérées sont triées alphabétiquement et l'occurrence de chacune est extraite (Figure 63-4).

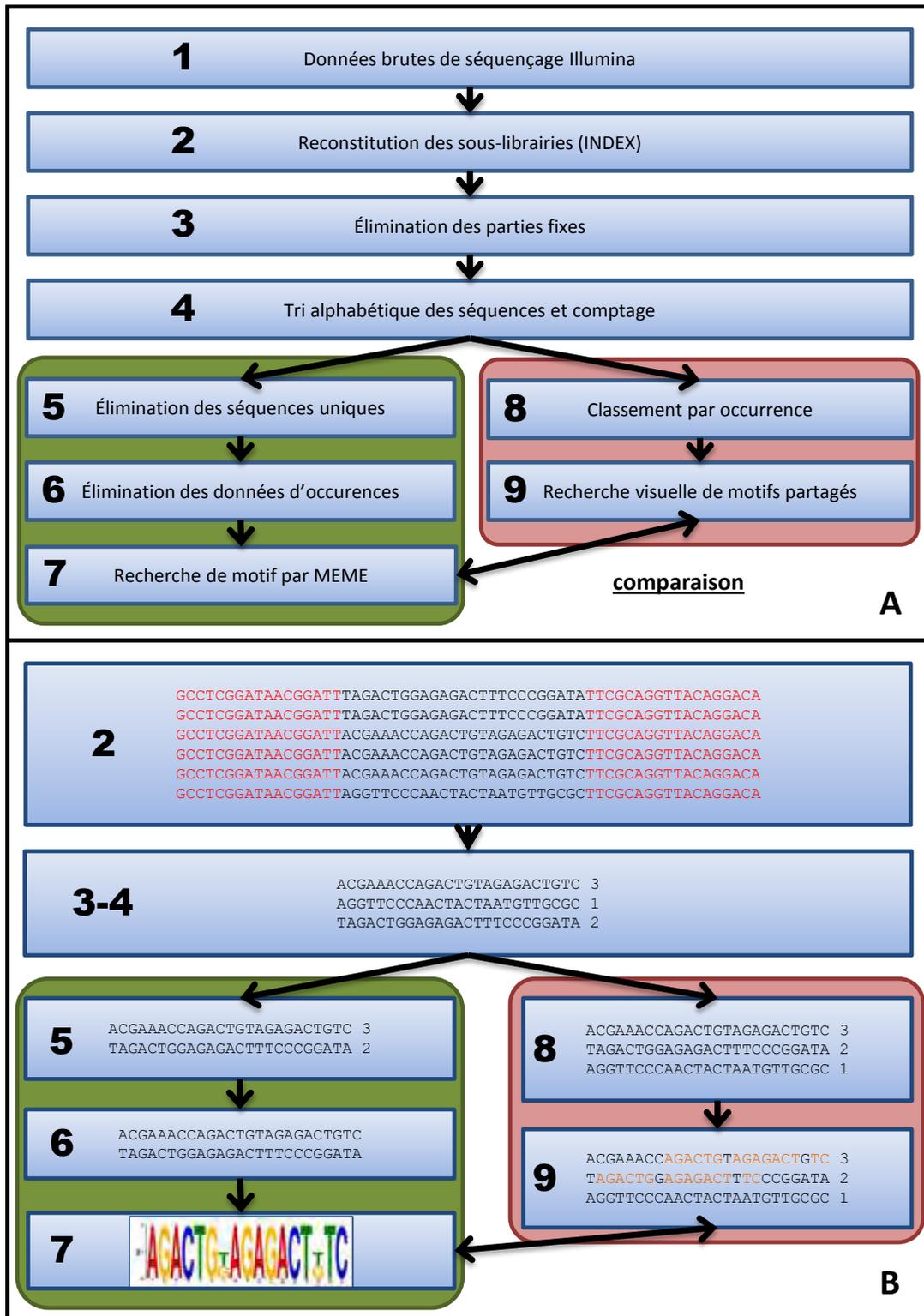
### 7.1 Recherche automatisée de motifs par MEME

Nous avons utilisé le logiciel d'analyse de motifs MEME pour obtenir le motif consensus sur un plus grand nombre de séquences. Nous nous sommes alors heurtés à la problématique de la très grande quantité de données pour effectuer des alignements. En effet, ne disposant pas d'une énorme capacité de calcul, nous nous sommes efforcés à ne pas traiter plus de 4 000 séquences simultanément par MEME. Le découpage systématique de chaque cycle en blocs de 4 000 séquences ne semble pas une bonne option car elle empêcherait l'émergence de motifs faiblement représentés.

Les séquences représentées seulement une fois sont éliminées afin de diminuer la complexité de l'analyse et permettre une analyse par le programme de recherche de motifs MEME (Figure 63-5). Nous avons ensuite attribué une occurrence de 1 à chaque séquence restante, c'est-à-dire initialement présente en plusieurs copies (Figure 63-6). Ce traitement permet de réduire le nombre total de séquences à moins de 4 000 pour la quasi-totalité des sous-librairies et de rechercher les motifs par MEME en une analyse par cycle (Figure 63-7).

### 7.2 Recherche manuelle de motifs (faite sur le Cell-selex)

Les séquences obtenues sont classées par ordre décroissant d'occurrence (Figure 63-8). Afin d'extraire des sous-librairies un nombre de séquences analysables, toutes les séquences représentant une fraction plus grande que 0,025% de la sous-librairie sont analysées. Des motifs sont ainsi identifiés à l'œil et un code couleur leur est attribué (Figure 63-9).



**Figure 63 :** Traitement des données de séquençage haut-débit Illumina. *Un traitement commun aux deux méthodes d'analyse a d'abord été appliqué (1-4) puis des spécificités ont été introduites pour la recherche manuelle (encadré rouge) et la recherche automatisée (encadré vert) de motifs (A). Illustration sur des séquences issues du Cell-SELEX (B).*

## 8 Tests d'affinité :

Tous les tests d'affinité sur cellules ont été pratiqués dans le tampon de liaison utilisé lors du Cell-SELEX (voir section Méthodologie-4).

### 8.1 Radiomarquage sur cellules platées :

Les cellules ont été mises en culture dans des plaques 24 puits (Nunc) et utilisées à 80% de confluence. 8 pmoles de séquences ADNsb ont été marquées en 5' par incubation avec de l'ATP gamma  $^{32}\text{P}$  et de la T4 polynucléotide kinase. Les oligonucléotides ont ensuite été purifiés sur colonne G25. Des gammes de concentration allant de 25 pM à 5 nM d'ADNsb marqués ont été préparées et structurés dans le tampon de liaison utilisé en Cell-SELEX, comme décrit précédemment (section Méthodologie-4). Le glucose, la BSA et les ARNt de Torula ont été rajoutés après le chauffage à 95°C. Les cellules ont été mises à incuber avec les ADNsb radiomarqués pendant 30 minutes sur glace et sous agitation dans un volume de 200 µL. Le surnageant a été prélevé puis deux lavages de 5 minutes par 500 µL de tampon de lavage ont été effectués sur glace et sous agitation. Enfin, les cellules ont été raclées dans 500 µL de tampon de lavage et la radioactivité de chaque échantillon dosée.

### 8.2 Marquage fluorescent en Cytométrie de flux :

Plusieurs protocoles ont été utilisés pour la mise en suspension des cellules. Les cellules sont utilisées lorsqu'elles atteignent 80% de confluence dans la flasque de culture.

Méthode non-enzymatique : Les cellules ont été rincées une fois au DPBS sans sels avant incubation avec une solution de DPBS sans sels à 0,1 M EDTA. Les volumes utilisés ont été de 5 mL pour une T25 et de 15 mL pour une T75. La flasque a été laissée 10 minutes en incubateur à 37°C puis les cellules prélevées et centrifugées à 4 000 g pendant 5 minutes.

Méthode enzymatique : Les cellules ont été rincées une fois au DPBS sans sels avant incubation avec une solution de Trypsine-EDTA commerciale à 0,05%. Les volumes utilisés ont été de 250 µL pour une T25 et de 750 µL pour une T75. La

flasque a été laissée 5 minutes en incubateur à 37°C puis les cellules prélevées et centrifugées à 4 000 g pendant 5 minutes. Pour une digestion douce visant à conserver un maximum de marqueurs de surface, un décrochage enzymatique a été pratiqué la veille de l'expérience et les cellules réensemencées à la même confluence. Une digestion de 1 minute est alors suffisante le jour de l'expérience pour décrocher les cellules. Une étape de réexpression des marqueurs a parfois été pratiquée en incubant les cellules décrochées de 1 à 3 h dans du milieu de culture sous agitation à 37°C.

Pour le marquage des cellules, la solution de décrochage a été éliminée après centrifugation puis les cellules resuspendues dans 2 mL de milieu de culture pour comptage. Des lots de 250 000 cellules ont été répartis dans des eppendorfs de 1,5 mL correspondant à chaque condition analysée. A partir de cette étape tout a été pratiqué en chambre froide à 4°C. Les échantillons sont centrifugés à 1 000 g pendant 1 minute, le milieu éliminé puis deux rinçages dans le tampon de liaison ont été pratiqués. Les cellules ont été incubées 30 minutes en présence de 250 nM d'ADNsb structurés sur roue tournante. Deux rinçages ont été réalisés avec le tampon de liaison puis les cellules ont été resuspendues dans 400 µL de tampon de liaison pour passage au cytomètre FACScalibur.

## Conclusion

---

## 1 Purification des ADNsb à partir de Banques ADN :

Les résultats présentés en première partie apportent des données nouvelles sur les séquences générées par l'utilisation d'amorces contenant des terminateurs de polymérisation. Ce type d'amorce sert à l'obtention de produits PCR de brins de longueur inégale, dans le but de purifier l'ADNsb correspondant à la librairie. Ils ont fait l'objet d'une publication dans le journal PlosOne en 2011 (section Résultats-1.1). Nous avons caractérisé un nouveau type de terminateur fort basé sur la présence de contraintes au sein de la matrice. L'introduction de deux CNA contigus entraîne l'arrêt de l'élongation pour les deux ADN polymérases testées : *Pfu* et *Taq*. Des données supplémentaires non publiées ont également été acquises quant au comportement de ces deux polymérases lorsque les deux contraintes introduites par les 2 CNA sont espacées dans la matrice. La *Pfu* aura tendance à stopper son élongation face à la première contrainte alors que la *Taq* stoppera à la seconde. Ceci semble indiquer une plus grande tolérance de la *Taq* face à la rigidité de la matrice ADN (section Résultats-1.2).

Nous avons adopté la stratégie utilisant des terminateurs de polymérisation pour les SELEX contre IL-8. Le Cell-SELEX et le SELEX IL-6 ont été réalisés par purification des ADNsb sur billes de streptavidine. Le rendement faible de cette méthode de purification (environ 35%) conduit à produire une grande quantité d'amplicons afin d'obtenir 200 pmoles d'ADNsb purifié. Afin de limiter la production de produits PCR non désirés, la concentration en matrice doit rester aussi faible que possible. Nous réalisons donc un faible nombre de cycles sur un grand volume dans un protocole ici nommé de PCR en cascade (section Méthodologie-5).

## 2 SELEX contre IL-8 :

Deux sélections ont été réalisées contre l'interleukine-8 : une en CE-SELEX et l'autre en Filter-Binding SELEX. Concernant le SELEX en électrophorèse capillaire, 3 cycles de non-SELEX ont été effectués, suivis d'un cycle de SELEX classique avec amplification des séquences (section Résultats-2.1). Les candidats séquencés n'ont

pas permis d'identifier de motif enrichi dans la population. Cependant la plupart des séquences analysées sont capables de structuration forte d'après l'analyse réalisée avec Mfold. 2 des séquences semblent présenter une structuration de type G-quadruplex. Les tests d'affinité pratiqués en CE ainsi qu'en Filter-Binding n'ont pas permis d'attester de l'interaction de ces séquences avec la cible IL-8.

Le Filter-Binding SELEX qui a été effectué sur 11 cycles a permis de voir un enrichissement en séquences liantes d'après la quantité de séquences extraites après le partitionnement (**Figure 23**). L'interaction de la sous-librairie du cycle 6 a également révélé une diminution du rendement de fluorescence en présence de concentrations croissantes en IL-8, semblant indiquer l'établissement d'interactions. Les 11 sous-librairies ont été soumises à un séquençage haut-débit et aucun enrichissement n'a pu être observé, si ce n'est pour des séquences aux parties dégénérées très courtes (de 6 à 9 nts). Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre les séquences identifiées par l'approche CE-SELEX et Filter-Binding SELEX.

### 3 Cell-SELEX sur NIH:OVCAR3 :

Le but de ce Cell-SELEX est d'identifier des aptamères spécifiques pour la protéine extra-membranaire Mucine16 (section Résultats-3). La lignée épithéliale ovarienne cancéreuse NIH:OVCAR3 qui surexprime la Mucine16 a été utilisée pour la sélection et la lignée SK-OV-3, qui n'exprime pas la Mucine16, pour la contre-sélection. Une lignée NIH:OVCAR3 GFP et éteinte pour Muc16 a été créée par une stratégie ShRNA (NIH:OVCAR3 Muc16Sh-GFP), elle sera utilisée pour tester la spécificité des aptamères sélectionnés pour la cible Mucine16. Cette lignée n'a pas servi à la contre-sélection car nous ne pouvons pas garantir son absence totale d'expression de la Mucine16. Nous avons suivi l'enrichissement par quantification des séquences extraites des cellules et par FACS. Après 20 cycles de Cell-SELEX, nous avons constaté la surabondance de séquences plus longues que la librairie dans nos produits PCR, ceci nous a conduit à arrêter la procédure de sélection et à identifier les séquences. Une stratégie de clonage a été adoptée en parallèle du séquençage haut-débit des sous-librairies générées. Les séquences identifiées par clonage sont également présentes en haut-débit même si les taux de représentation

différent. Les séquences plus longues se sont avérées être constituées de deux séquences dégénérées associées. Un enrichissement est clairement notable en séquences pouvant être regroupées en 9 familles de motifs. Les évolutions des différents motifs au cours du processus de sélection ont été déterminées, puis les évolutions de chacune des principales séquences à l'intérieur de chaque motif. Par comparaison des représentativités entre les sous-librairies sélectionnées et contre-sélectionnées, des séquences individuelles ont été choisies pour tester leur capacité de liaison aux cellules. La difficulté rencontrée à attester de l'affinité de ces séquences enrichies réside dans l'absence de contrôle négatif satisfaisant, aussi bien en test de radio-liaison sur cellules platées qu'en FACS. Les investigations menées en cytométrie de flux ont permis de mettre clairement en évidence la présence d'une population de cellules que l'on qualifiera de perméables, capables de fixer n'importe quel ADNsb. Un traitement trypsique permet de réduire significativement cette population de cellules. Cependant, il est possible qu'il entraîne également la perte d'aptatopes à la surface cellulaire et donc la fixation des candidats aptamères. L'approche à privilégier semble désormais être une mise en suspension des cellules par traitement non enzymatique combiné à l'utilisation de marqueur de perméabilité. Nous pourrions ainsi exclure la population perméable de nos analyses sans affecter la présence des aptatopes.

Une publication fait état de la possibilité de sélectionner des aptamères ciblant la streptavidine lors de Cell-SELEX si la technique de purification des ADNsb utilise des billes recouvertes de streptavidine (Paul et al. 2009). Nous avons utilisé cette technique lors de notre Cell-SELEX, aussi des tests de liaison à la streptavidine devront être pratiqués pour écarter cette éventualité. La convergence des séquences de la librairie vers quelques familles de motifs semble être le résultat d'une sélection efficace, cependant la capacité de liaison des candidats aptamères testés individuellement n'a pas pu être attestée.

Au cours de cette thèse, l'approche bio-informatique utilisée pour le traitement des données issues du séquençage haut-débit est basique. La majorité des résultats ont été obtenus par classement en occurrence décroissante des séquences à l'intérieur de chaque sous-librairie, et par une recherche visuelle de motifs partagés. L'utilisation de l'outil MEME n'a pas permis d'identifier de motifs supplémentaires. Des approches plus sophistiquées existent dans la littérature et sont développées en

section Introduction-10. Il s'agit de suivre le taux d'enrichissement de chaque séquence d'un cycle au suivant pour identifier les plus forts enrichissements ou de rechercher la présence de k-mers ou encore de procéder à l'analyse structurale des bibliothèques pour identifier des familles structurales. Il serait intéressant de développer plus avant nos compétences en la matière et de rechercher les candidats les plus intéressants par chacune de ces approches.

Comme on peut le voir en **figure 35**, la plupart des motifs sont constitués de séquences partageant une identité sur quelques nucléotides et totalement différentes sur le reste de la partie dégénérée. Ceci indique qu'une évolution a bien eu lieu pour sélectionner les séquences possédant cette courte séquence de nucléotides au sein d'une population diverse. Aussi, nous ne doutons pas de la capacité de ces séquences à remplir une fonction définie. Cependant il nous reste à déterminer laquelle en testant en priorité la capacité à lier un composé à la surface des cellules NIH:OVCAR3.

## 4 SELEX contre la GFP :

Un SELEX sur billes magnétiques a été précédemment réalisé au sein de l'équipe contre une GFP possédant un tag 6-histidine. 15 cycles avaient été réalisés et les cycles 4, 10 et 15 clonés pour l'identification des séquences. Un enrichissement a été constaté et 3 séquences majoritaires ont été testées pour leur affinité en Filter-Binding. Le candidat aptamère Gfp-3 semblait posséder une meilleure affinité que les deux autres séquences mais le manque de reproductibilité des résultats de liaison ont conduit à la non-publication de ces travaux. La réalisation d'un séquençage haut-débit au cours de cette thèse a permis de reprendre ce projet en analysant les sous-bibliothèques sélectionnées contre la GFP en même temps que les autres SELEX. Les candidats Gfp-1 et Gfp-3 identifiées par clonage sont également surreprésentées en séquençage haut-débit. Le candidat Gfp-2 est en revanche très peu représenté d'après les résultats de séquençage haut-débit. Il comprend un motif identifié mais est l'un de ses représentants les moins abondants (section Résultats-4). Ceci porte à penser qu'il existe un puissant biais de clonage.

## 5 Utilisation de l'Aptamère Décrit Anti-Mucine1 :

Nous avons comparé le marquage fluorescent par un anticorps et un aptamère ciblant tous deux la protéine extra-membranaire Mucine1 (section Résultats-5). Ces résultats sont présentés sous la forme d'une publication du journal *Nucleic Acid Therapeutics* parue en 2014. Le marquage a été effectué sur des sphéroïdes de cellules MCF-7. L'anticorps montre un marquage exclusivement périphérique avec une incapacité à pénétrer le sphéroïde, même sur les couches externes. En revanche l'aptamère parvient, de par sa plus petite taille, à pénétrer profondément le sphéroïde et à marquer la totalité des cellules imagées. L'utilisation d'une séquence contrôle met encore une fois de plus en évidence la capture non-spécifique d'ADNs par une population de cellules perméables.

## 6 Discussions Générales :

### 6.1 Accrochage « non-spécifique » sur cellules :

Le Cell-SELEX a été effectué sur cellules adhérentes et la nécessité de leur mise en suspension pour l'analyse en FACS peut induire soit le clivage des cibles à la surface cellulaire (par trypsinisation) soit la perméabilisation d'une grande proportion de cellules et leur fort marquage (méthode non-enzymatique - EDTA) (**Figure 52**). Une solution envisagée est de marquer les cellules par un marqueur de viabilité après leur décrochage non-enzymatique. Ainsi nous pourrions exclure les cellules perméables de l'analyse et éliminer le fort marquage « non-spécifique ». Cependant nous n'avons pas de certitude sur la mortalité des cellules marquées fortement par les oligonucléotides. Peut-être sont-elles perméables transitoirement ? Des explications restent à fournir sur cette population cellulaire fortement marquée par n'importe quel oligonucléotide dans nos conditions d'utilisation. Une autre solution pourrait venir de l'observation des résultats sur la lignée cellulaire NIH:OVCAR3 ShMuc16-GFP : les cellules non GFP observées dans la population sont perméables (**Figure 51**) et sont marquées par tous les oligonucléotides de manière « non-spécifique ». L'exclusion des cellules GFP négatives de l'analyse

réduit considérablement ce signal indésirable. Une solution pour la validation de nos candidats pourrait donc être d'utiliser une lignée NIH:OVCAR3 GFP en FACS et d'éliminer les cellules non-GFP de l'analyse.

La forte capacité de fixation des oligonucléotides aux cellules perméables pourrait expliquer les observations faites lors des tests de liaison sur cellules platées avec des séquences radio-marquées. Nous avons observé un phénomène de saturation avec les séquences témoins, ce qui ne correspond pas à un marquage non-spécifique classique (**Figure 46**). L'hypothèse formulée est que les séquences utilisées en témoin quelles qu'elles soient ont pu rentrer dans les cellules perméables et se fixer aux acides nucléiques présents. Lors des tests de marquage fluorescent avec l'aptamère décrit anti-Mucine1 sur cellules platées, nous avons constaté qu'il arrive qu'un marquage nucléaire soit observé en plus du marquage membranaire, notamment lorsque les cellules ont été fixées. Il est à noter que la fixation peut parfois s'accompagner d'une perméabilisation et donc rendre le noyau accessible à nos oligonucléotides, qui s'y accumulent.

Les intensités de marquage obtenues par une séquence témoin unique ou par une librairie sont différentes. Nous avons constaté que le marquage est plus important avec une librairie qu'avec une séquence unique (**Figure 49**). Ceci mène à penser que ce marquage se fait par hybridation sur des séquences définies au sein des cellules perméables. Une séquence unique rencontrera nécessairement moins de sites de liaison possibles qu'une librairie et entrainera un marquage moins important. Nous avons cherché à limiter le signal créé par l'accumulation des témoins dans les cellules perméables par l'utilisation de témoins à séquence unique plutôt qu'une librairie.

## 6.2 Quel avenir pour le SELEX d'aptamères ?

Une proportion importante des aptamères publiés dans le cadre de leur SELEX ne font pas l'objet de nouvelles publications à court terme portant sur leur application. La plupart des laboratoires cherchant à utiliser des outils aptamères se basent sur des séquences déjà largement validés (l'aptamère anti-thrombine par exemple). Pourquoi les laboratoires qui pratiquent le SELEX ne développent-ils pas immédiatement d'applications avec le nouvel outil de reconnaissance moléculaire qu'ils ont identifié ? Ceci pourrait traduire la difficulté à maintenir l'interaction pour la

plupart des aptamères vis-à-vis de leur cible après modification ou dans des contextes biochimiques différents de ceux utilisés lors du SELEX.

La plupart des entreprises basées sur le développement d'aptamères pratiquent de la sélection automatisée en utilisant des cibles solubles et immobilisées sur un support. Devant la grande quantité d'aptamères présents dans leurs catalogues (**Figure 64**), on peut se demander l'utilité de pratiquer des SELEX de manière non-automatisée dans les laboratoires de recherche. Surtout lorsque ce SELEX se fait contre une cible soluble et identifiée. Cependant, la course à l'obtention d'aptamères poussant ces entreprises à automatiser les processus de sélection, la mise au point de conditions spécifiques à une cible ne semble pas une priorité. Aussi des doutes existent sur l'efficacité des aptamères issus de leurs catalogues. La communication semble parfois prévaloir sur la qualité du produit proposé.

Cette thèse démontre la difficulté et la quantité importante de travail nécessaire à la réalisation des SELEX sans que cela aboutisse de manière sûre à l'identification d'aptamères et à la caractérisation de leur interaction avec la cible. Les laboratoires de recherche présentent un manque de compétitivité évident dans l'identification d'aptamères par rapport aux entreprises spécialisées. Leur capacité de screening est largement déficitaire vis-à-vis de la sélection automatisée. Les meilleurs laboratoires de recherche sur le sujet ont publié chacun une dizaine d'aptamères contre des cibles différentes quand dans un même temps une entreprise privée en a identifié parfois des centaines. Il y a peut-être un parallèle à faire avec la technologie anticorps une fois de plus : le temps où les anticorps étaient produits en laboratoire est désormais révolu, leur réalisation a été déléguée à des entreprises. Il pourrait en être de même pour les aptamères si l'expansion de leur utilisation se poursuit.

L'avenir du SELEX dans les laboratoires publics pourrait alors se tourner vers la pratique du Cell-SELEX ; cette technique n'ayant jusqu'à présent pas été automatisée. La principale limite étant la grande quantité de travail que cela représente.

Cependant les méthodes de SELEX tendent à innover dans la capacité à identifier des aptamères en réduisant au maximum le nombre de cycles. Deux

composantes sont principalement sujettes à favoriser la réduction des étapes pour l'obtention d'un SELEX plus efficace : un partitionnement plus résolutif et une identification plus précoce des séquences enrichies.

Entreprise	Nombre d'aptamères au catalogue
SOMALogic	> 1800
AptaGen	412
OTCbiotech	85
CD genomics	366 dont les 85 d'OTCbiotech
AptamerSci. Inc.	204
BasePairBio	> 200 mais seulement 40 au catalogue
NOXXON Pharma	7 spiegelmers en phase clinique
NeoVentures	69 issus de la littérature scientifique

**Figure 64 : Principales entreprises commercialisant des aptamères.**

Les méthodes de partitionnement très résolutive (électrophorèse capillaire, résonance plasmonique de surface ou systèmes microfluidiques) permettent d'accélérer l'enrichissement en séquences spécifiques en éliminant un maximum de séquences non-spécifiques (Cho et al. 2011; Oh et al. 2011; Huang et al. 2010; Ahmad et al. 2011; Qian et al. 2009; Mendonsa & Bowser 2004b; Mosing et al. 2005; Misono & Kumar 2005; Khati et al. 2003). Parmi ces évolutions, seule la microfluidique semble adaptable à la réalisation de Cell-SELEX.

Le développement des systèmes de séquençage haut-débit a permis en outre d'accéder à un plus grand nombre de séquences pour l'analyse et de détecter les enrichissements plus précocement (k-mers, analyse structurale ou approche acyclique), réduisant le nombre de cycles à effectuer jusqu'à la réalisation de SELEX acyclique en une seule interaction avec la cible (Thiel et al. 2012; Hoon et al. 2011; Ditzler et al. 2012; Kupakuwana et al. 2011; Schütze et al. 2011).

Une approche pertinente pourrait alors être de combiner ces observations par la réalisation de Cell-SELEX couplé à un séquençage haut-débit dans une sélection acyclique. Lors de l'approche acyclique publiée, 56 000 représentants de chaque séquence ont été incubés avec une cible unique (la thrombine). Sur les 1,7 millions de séquences obtenues, 82% des séquences n'ont été observées qu'une seule fois et 107 séquences avaient une occurrence supérieure à 11. La comparaison de ces 107 séquences a permis d'identifier 2 familles de motifs, une liant la thrombine et l'autre liant l'alpha-méthyl manoside présent dans la solution de concanavaleine A utilisée pour l'immobilisation. Ce dernier possède la troisième meilleure affinité ( $K_d = 500 \text{ nM}$ ) d'un aptamère connu contre une petite molécule. Le surcoût de séquençage engendré par ce type d'approche est compensé par le temps de travail nécessaire à l'identification des séquences dans un SELEX classique. Seulement quelques jours sont nécessaires en utilisant très peu de réactifs comparativement à la réalisation d'une dizaine de cycle de SELEX classique qui dure de plusieurs semaines à plusieurs mois (Kupakuwana et al. 2011). En revanche, la caractérisation de l'interaction et l'identification de la cible représenteront toujours une masse considérable de travail.

### 6.3 Les acides nucléiques en tant que plateformes :

Une sélection contre l'IL-6 a également été effectuée au cours de cette thèse par Filter-Binding SELEX. Cependant l'analyse des sous-librairies générées au cours de 7 cycles de sélection n'a pas permis d'identifier d'enrichissement de séquence ou de motif. Les résultats n'ont pas été présentés. Les deux Filter-Binding SELEX effectués contre les deux interleukines IL-6 et IL-8 ont conduit à la même observation. Les potentiels isoélectriques de ces deux protéines ont des valeurs prédites de 6,2 et 9,1 respectivement. Le tampon utilisé pour les sélections en Filter-Binding est à pH 8. A ce pH, l'IL-8 (pI 9,1) est globalement chargée négativement, ce qui pourrait expliquer la difficulté à établir des interactions avec la librairie ADNsb de par sa nature polyanionique. En revanche ceci ne constitue pas une explication à l'échec de la sélection contre IL-6, qui est globalement chargée positivement à ce pH. Il est fréquemment évoqué l'existence de « bonnes » et de « mauvaises » cibles pour un SELEX. Une « mauvaise » cible ne pouvant pas générer d'aptamères spécifiques. IL-6 et IL-8 constituent des cibles d'intérêt biologiques, le fait qu'il n'existe pas encore

d'aptamère publié contre ces cibles pose la question de leur disposition à former des interactions avec des ADNs.

Les acides nucléiques sont des plateformes idéales pour l'évolution moléculaire dirigée, mais leur nature initiale peut être développée dans le but d'augmenter les possibilités d'interaction. Aussi, l'avenir semble se tourner vers l'utilisation de bibliothèques modifiées. Comme développé en introduction, ces modifications peuvent viser à augmenter la stabilité des aptamères dans les liquides physiologiques. Mais le champ le plus important pourrait s'avérer être l'apport de modifications apportant de nouvelles propriétés physico-chimiques aux acides nucléiques. Ainsi, l'entreprise leader dans la sélection d'aptamères (SOMALogic) utilise des bibliothèques ADN dont les thymidines sont systématiquement remplacées par des désoxy-Uridines modifiées en position 5 (n'empêchant pas la reconnaissance par les enzymes utilisées en SELEX) par l'ajout de fonctions hydrophobes (Davies et al. 2012). Les acides nucléiques sont par nature fortement chargés négativement et très hydrophiles. L'adjonction de constituants hydrophobes augmente les possibilités d'établir des interactions fortes. Ceci peut s'avérer particulièrement utile pour la liaison aux sites d'interaction naturels des cibles ainsi que pour la structuration des aptamères. La même entreprise a publié dans un brevet US les résultats de SELEX effectués contre 14 cibles à partir de 4 bibliothèques dont 3 contenant des modifications. Pour ces 14 cibles, les aptamères les plus affins ont été systématiquement obtenus à partir d'une bibliothèque modifiée (Zichi et al. 2011). Les séquences obtenues à partir de la bibliothèque ADN possèdent pour la plupart un Kd supérieur à 100 nM sans toutefois qu'ils soient précisés, ces cibles pourraient donc être considérées comme « mauvaises » s'ils s'étaient limités à une bibliothèque non-modifiée. Cette considération mène à penser qu'il peut ne pas y avoir de « mauvaise » cible mais seulement de mauvaises combinaisons Bibliothèque-cible. Il serait donc envisageable d'effectuer des sélections efficaces contre IL-6 et IL-8 avec des bibliothèques d'acides nucléiques modifiés, possédant des propriétés physico-chimiques étendues par rapport à la bibliothèque ADN utilisée lors de cette thèse.

Une autre approche intéressante et innovante a été d'utiliser un ligand naturel de la cible greffé en position 5 de la desoxy-Uridine. La bibliothèque modifiée a été utilisée lors d'un SELEX. L'aptamère composite sélectionné présente une affinité 23 fois plus forte que la même séquence non modifiée. La liaison de cette construction est un million de fois plus forte par rapport à la liaison du ligand seul. Ce type de

construction, une librairie greffée au ligand naturel, est appelé X-aptamère (He et al. 2012).

Cependant l'utilisation de tels composés *in vivo* soulève la question du devenir de ces nucléotides modifiés covalamment au sein de l'organisme après dégradation de l'aptamère.

Les processus de SELEX ont sans cesse évolué pour pouvoir accéder à de nouvelles cibles, augmenter les affinités, définir les paramètres cinétiques d'interaction ou réduire la durée de leur réalisation. Cependant il semble impossible de prédire qu'un SELEX aboutisse à l'identification d'aptamères. Il n'existe pas de statistiques sur la probabilité de succès d'un SELEX mais il est certain que les possibilités d'écueil sont nombreuses. Des forums émergent au sein de la « communauté aptamère » mettant au jour les difficultés fréquemment rencontrées dans la réalisation de la sélection ou de la validation des aptamères mais peu de publications font état de ces problèmes. Un plus grand partage des expertises et des enseignements de chacun face à cette technique profiterait à toute la communauté et les demandes dans ce sens sont de plus en plus nombreuses de la part des jeunes chercheurs.

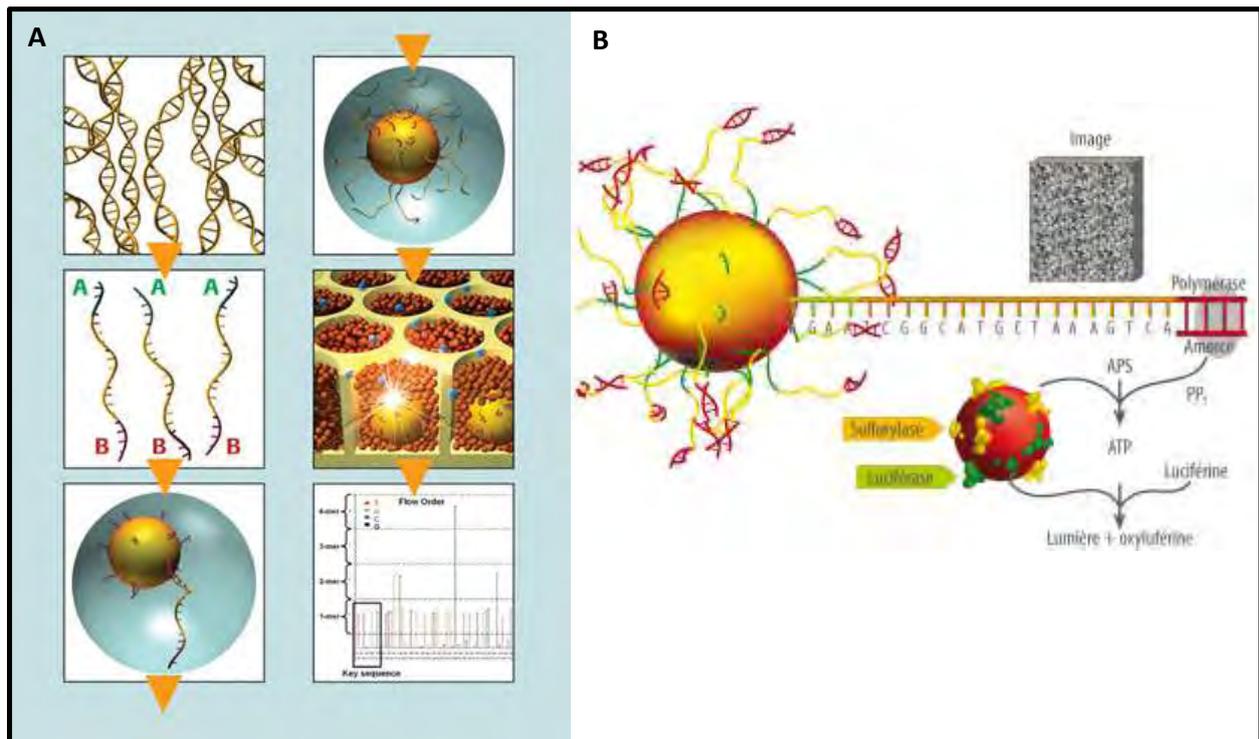


# Annexes

---

## Pyroséquençage Roche454 :

La technologie 454 commercialisée par 454 Life Sciences (Roche Applied Science) couple une méthode de PCR en émulsion et un pyroséquençage (**Figure 65**). Dans un premier temps les produits PCR sont ligués avec des adaptateurs à chaque extrémité. Un des adaptateurs étant biotinylé, les fragments sont immobilisés en dilution limite sur des billes portant de la streptavidine, de sorte à n'avoir qu'une seule séquence par bille. Puis les billes sont placées dans une émulsion où chaque bille est isolée dans une goutte, qui sera le microréacteur de la PCR. Cette étape d'amplification *in vitro*, très performante, permet de générer jusqu'à  $10^7$  fragments par bille à partir d'une seule séquence initiale (**Figure 65A**). Chaque bille est ensuite isolée dans un puits d'une plaque de très haute densité (plusieurs centaines de milliers de puits de 44  $\mu\text{m}$  de large) puis des microbilles portant deux enzymes, une ATP sulfurylase et une luciférase sont introduites. Le pyroséquençage consiste en la lecture directe des nucléotides incorporés (**Figure 65B**). Contrairement à une méthode de séquençage normale, les nucléotides ne sont pas ajoutés tous ensemble mais l'un après l'autre. Si le nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à la base complémentaire du brin séquencé, l'ADN polymérase l'incorpore dans le brin en cours de synthèse (d'élongation), ce qui entraîne la libération d'un pyrophosphate inorganique (PPi). L'ATP sulfurylase utilise alors ce PPi pour produire de l'ATP qui est utilisé par la luciférase pour transformer la luciférine en oxyluciférine. Cette réaction s'accompagne d'une émission de lumière qui est proportionnelle à la quantité de PPi libéré et donc au nombre de bases incorporées simultanément. Si deux bases successives sont identiques, il y aura deux fois plus de lumière émise. Une Apyrase dégrade les nucléotides en surplus avant l'ajout d'un nouveau désoxyribonucléotide.

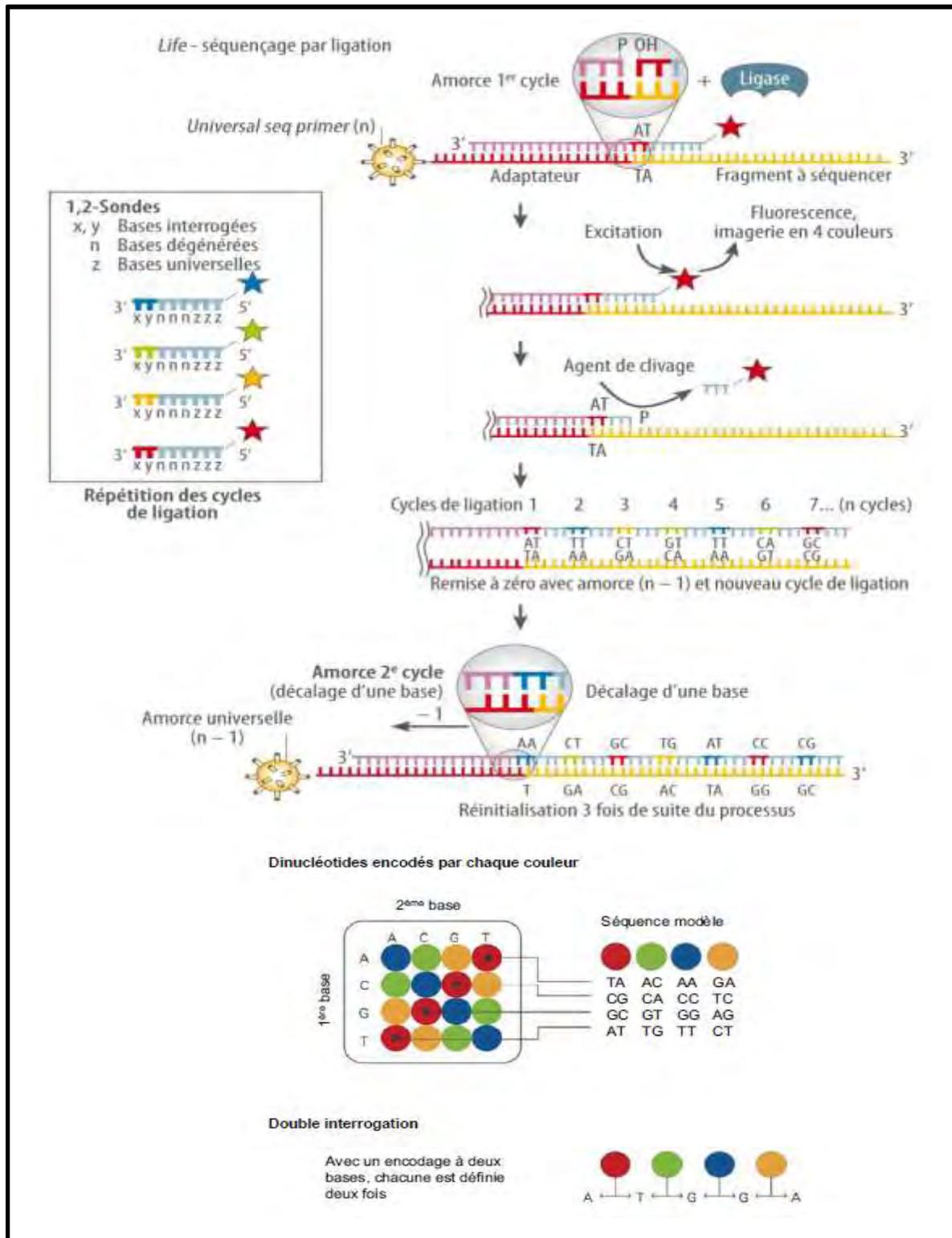


**Figure 65 : Méthode de pyroséquençage haut-débit Roche 454 technology.** La première étape consiste en l'obtention de populations de séquences clonales par PCR en émulsion (A). La séquence de chaque clone est ensuite lue (B). (Figure adaptée de (La lettre du cancérologue-juin 2012 par M.H. Stern)).

## Applied Biosystems SOLiD :

La troisième approche abordée, nommée SOLiD, est développée par Applied Biosystems et utilise la PCR en émulsion comme pour la technologie 454. Après ligation des adaptateurs sur les produits PCR, les fragments sont capturés sur des billes et amplifiés par PCR en émulsion (*cf* Pyroséquençage Roche 454). Les extrémités 3' des séquences sont modifiées pour permettre leur fixation covalente sur un support de verre où les billes sont déposées (plusieurs dizaines de millions de billes par lame de verre). Une fois immobilisées sur le support, les séquences sont hybridées avec une amorce complémentaire sur une longueur  $n$  à l'un des adaptateurs. Le séquençage commence alors mais sans utilisation d'ADN polymérase, la technologie SOLiD utilise un mélange d'oligonucléotides marqués et une ligase pour déterminer la séquence du brin d'ADN. Chaque oligonucléotide est

de formule 3' XX-NNN-YYY 5' et possède un des 16 couples de dinucléotides spécifiques pour les bases 1 et 2 (XX), est dégénéré sur les bases 3-5 (NNN) et 6-8 (YYY), et est marqué par un des quatre fluorochromes employés. Seules les bases XX donnent une information sur la séquence d'ADN. 4 étapes sont nécessaires pour explorer les 16 dinucléotides avec seulement 4 fluorochromes. Après hybridation de l'amorce de longueur  $n$ , le mélange d'oligonucléotides fluorescents (8-mers) est hybridé et ceux qui sont complémentaires s'hybrident et se retrouvent accrochés à l'amorce par la ligase. Les bases 1 et 2 sont identifiées par analyse de la longueur d'onde d'émission de fluorescence en chaque position de la lame de verre. Puis un clivage chimique libère le fluorochrome ainsi que les bases 6 à 8 (YYY), laissant une extrémité 5' phosphate libre. Les étapes précédentes sont ensuite répétées à partir de l'incubation avec les oligonucléotides et la séquence d'ADN est déterminée deux à deux sur les positions 1-2, 6-7, 11-12, 16-17, *etc...* Puis l'ensemble est réinitialisé en déshybridant l'amorce allongée et une nouvelle amorce de longueur  $n-1$  est hybridée, permettant d'interroger les bases 1, 5-6, 10-11, 15-16, *etc...* L'opération est ensuite répétée avec une amorce de longueur  $n-2$ , puis  $n-3$  et  $n-4$ . La succession de cinq cycles complets d'hybridation et d'extension par ligation permet de générer des données chevauchantes sur chaque nucléotide. L'interrogation de chaque base de la séquence par deux dinucléotides différents permet de connaître son identité (puisque seulement quatre fluorochromes sont utilisés, une seule lecture ne suffit pas à déterminer le dinucléotide) (**Figure 66**).



**Figure 66 : Méthode de séquençage haut-débit SOLiD.** Après une PCR en émulsion, la technologie SOLiD utilise la ligation et l'utilisation d'un encodage pour identifier les séquences. (Figure adaptée de (La lettre du cancérologue-juin 2012 par M.H. Stern)).



## Références

---

- Agarwal, R. & Kaye, S.B., 2003. Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 3(7), pp.502–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12835670> [Accessed August 9, 2013].
- Ahmad, K.M. et al., 2011. Probing the limits of aptamer affinity with a microfluidic SELEX platform. *PloS one*, 6(11), p.e27051. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3215713&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 5, 2013].
- Ara, M.N. et al., 2012. Development of a novel DNA aptamer ligand targeting to primary cultured tumor endothelial cells by a cell-based SELEX method. *PloS one*, 7(12), p.e50174. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3514264&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 23, 2013].
- Avci-Adali, M. et al., 2010. Pitfalls of cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX): existing dead cells during in vitro selection anticipate the enrichment of specific aptamers. *Oligonucleotides*, 20(6), pp.317–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21133818> [Accessed July 23, 2013].
- Avci-Adali, M. et al., 2013. Potential capacity of aptamers to trigger immune activation in human blood. *PloS one*, 8(7), p.e68810. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3720859&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 21, 2013].
- Avci-Adali, M. et al., 2009. Upgrading SELEX technology by using lambda exonuclease digestion for single-stranded DNA generation. *Molecules*, pp.1–11. Available at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/15/1/1> [Accessed July 25, 2013].
- Azenshtein, E. et al., 2005. The angiogenic factors CXCL8 and VEGF in breast cancer: regulation by an array of pro-malignancy factors. *Cancer letters*, 217(1), pp.73–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15596298> [Accessed September 19, 2013].
- Bandekar, A. et al., 2012. Antitumor efficacy following the intracellular and interstitial release of liposomal doxorubicin. *Biomaterials*, 33(17), pp.4345–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22429980> [Accessed October 9, 2013].
- Bast, R. et al., 1983. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *The New England Journal of Medecine*, 309(15), pp.883–887.
- Bast, R. et al., 1981. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *The Journal of clinical investigation*, 68(5), pp.1331–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2317833>.
- Bast, R.C., Hennessy, B. & Mills, G.B., 2009. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nature reviews. Cancer*, 9(6), pp.415–28. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2814299&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 7, 2013].
- Bayrac, A., Sefah, K. & Parekh, P., 2011. In vitro selection of DNA aptamers to glioblastoma multiforme. *ACS chemical Neuroscience*, 2(3), pp.175–181. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cn100114k> [Accessed July 23, 2013].
- Bell, D. & DeMarini, D., 1991. Excessive cycling converts PCR products to random-length higher molecular weight fragments. *Nucleic acids research*, 19(18), p.5079. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC328818/> [Accessed July 23, 2013].
- Berezovski, M. et al., 2005. Nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures: a universal tool for development of aptamers. *Journal of the American Chemical Society*, 127(9), pp.3165–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15740156>.
- Berezovski, M. et al., 2006. Non-SELEX selection of aptamers. *Journal of the American Chemical Society*, 128(5), pp.1410–1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406423>.
- Berezovski, M. V et al., 2008. Aptamer-facilitated biomarker discovery (AptaBiD). *Journal of the American Chemical Society*, 130(28), pp.9137–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18558676>.
- Beyer, S., Dittmer, W.U. & Simmel, F.C., 2005. Design Variations for an Aptamer-Based DNA Nanodevice. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 1(1), pp.96–101. Available at: <http://www.ingentaselect.com/rpsv/cgi-bin/cgi?ini=xref&body=linker&reqdoi=10.1166/jbn.2005.007> [Accessed August 6, 2013].
- Bibby, D.F. et al., 2008. Application of a novel in vitro selection technique to isolate and characterise high affinity DNA aptamers binding mammalian prion proteins. *Journal of virological methods*, 151(1), pp.107–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18433888> [Accessed October 6, 2013].
- Bing, T. et al., 2010. Conservative secondary structure motif of streptavidin-binding aptamers generated by different laboratories. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(5), pp.1798–805. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20153201> [Accessed July 23, 2013].
- Bittker, J. a, Le, B. V & Liu, D.R., 2002. Nucleic acid evolution and minimization by nonhomologous random recombination. *Nature biotechnology*, 20(10), pp.1024–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2819268&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Blalock, T.D. et al., 2007. Functions of MUC16 in corneal epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(10), pp.4509–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17898272> [Accessed July 22, 2013].
- Blank, M. et al., 2001. Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen. *The Journal of biological chemistry*, 276(19), pp.16464–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11279054> [Accessed May 24, 2013].
- Bock, L. et al., 1992. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v355/n6360/abs/355564a0.html> [Accessed August 20, 2013].
- Bookman, M. a et al., 2009. Evaluation of new platinum-based treatment regimens in advanced-stage ovarian cancer: a Phase III Trial of the Gynecologic Cancer Intergroup. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(9), pp.1419–25. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2668552&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 12, 2013].
- Borbas, K.E. et al., 2007. Design and synthesis of mono- and multimeric targeted radiopharmaceuticals based on novel cyclen ligands coupled to anti-MUC1 aptamers for the diagnostic imaging and targeted radiotherapy of cancer. *Bioconjugate chemistry*, 18(4), pp.1205–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17583928>.
- Bouvet, P., 2000. Determination of Nucleic Acid Recognition Sequences by SELEX. *Methods in Molecular Biology*, 148.
- Boyapati, V. et al., 2012. Basis for ligand discrimination between ON and OFF state riboswitch conformations: The case of the SAM-I riboswitch. *RNA*, pp.1230–1243. Available at: <http://rnajournal.cshlp.org/content/18/6/1230.short> [Accessed September 30, 2013].
- Bristow, R.E. et al., 2002. Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(5), pp.1248–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11870167>.
- Burges, A. & Schmalfeldt, B., 2011. Ovarian cancer: diagnosis and treatment. *Deutsches Ärzteblatt international*, 108(38), pp.635–41. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3198226&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 11, 2013].
- Burmeister, P.E. et al., 2005. Direct in vitro selection of a 2'-O-methyl aptamer to VEGF. *Chemistry & biology*, 12(1), pp.25–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15664512> [Accessed October 4, 2013].

- Canney, P. a et al., 1984. Ovarian cancer antigen CA125: a prospective clinical assessment of its role as a tumour marker. *British journal of cancer*, 50(6), pp.765–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1977011&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cannistra, S., 2004. Cancer of the ovary. *New England Journal of Medicine*, pp.2519–2529. Available at: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra041842> [Accessed September 10, 2013].
- Castells, M. et al., 2012. Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer letters*, 326(1), pp.59–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22824244> [Accessed June 6, 2013].
- Cerchia, L. et al., 2005. Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase. *PLoS biology*, 3(4), p.e123. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1065267&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 6, 2013].
- Charlton, J., Sennello, J. & Smith, D., 1997. In vivo imaging of inflammation human neutrophil elastase using an aptamer inhibitor of. *Chemistry & biology*, 4, pp.809–816.
- Chen, H.W. et al., 2008. Molecular recognition of small-cell lung cancer cells using aptamers. *ChemMedChem*, 3(6), pp.991–1001. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3544301&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 24, 2013].
- Chitcholtan, K., Sykes, P.H. & Evans, J.J., 2012. The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer. *Journal of translational medicine*, 10(1), p.38. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3316127&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 27, 2013].
- Cho, M. et al., 2011. Quantitative selection of DNA aptamers through microfluidic selection and high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), pp.15373–15378. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3053964&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 30, 2013].
- Chou, C.-H. et al., 2005. Up-regulation of interleukin-6 in human ovarian cancer cell via a Gi/PI3K-Akt/NF-kappaB pathway by lysophosphatidic acid, an ovarian cancer-activating factor. *Carcinogenesis*, 26(1), pp.45–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15471896> [Accessed July 23, 2013].
- Cibiel, A., Pestourie, C. & Ducongé, F., 2012. In vivo uses of aptamers selected against cell surface biomarkers for therapy and molecular imaging. *Biochimie*,

- 94(7), pp.1595–606. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22738730> [Accessed June 17, 2013].
- Ciesiolka, J., Gorski, J. & Yarus, M., 1995. Selection of an RNA domain that binds Zn<sup>2+</sup>. *RNA*, 1(5), pp.538–50. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1482428&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Clarke, J., 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 16(20), pp.9677–9686.
- Cowperthwaite, M. & Ellington, A., 2008. Bioinformatic analysis of the contribution of primer sequences to aptamer structures. *Journal of molecular evolution*, 67(1), pp.95–102. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00239-008-9130-4> [Accessed August 21, 2013].
- Daniels, D. a et al., 2003. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), pp.15416–21. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=307582&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Dausse, E. et al., 2011. HAPIScreen, a method for high-throughput aptamer identification. *Journal of nanobiotechnology*, 9(1), p.25. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3127992&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 18, 2013].
- Davies, D.R. et al., 2012. Unique motifs and hydrophobic interactions shape the binding of modified DNA ligands to protein targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(49), pp.19971–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3523867&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 17, 2013].
- Davis, H.M., Zurawski, V.R. & Bast, R.C., 1986. Characterization of the CA 125 Antigen Associated with Human Epithelial Ovarian Carcinomas Characterization of the CA 125 Antigen Associated with Human Epithelial Ovarian Carcinomas. *Cancer Research*, 46, pp.6143–6148.
- Ditzler, M. a et al., 2012. High-throughput sequence analysis reveals structural diversity and improved potency among RNA inhibitors of HIV reverse transcriptase. *Nucleic acids research*, pp.1–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3561961&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 30, 2013].
- Dongari-Bagtzoglou, A. & Kashleva, H., 2006. Development of a highly reproducible three-dimensional organotypic model of the oral mucosa. *Nature protocols*, 1(4), pp.2012–2018. Available at:

- <http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n4/abs/nprot.2006.323.html> [Accessed October 9, 2013].
- Drabovich, A., Berezovski, M. & Krylov, S.N., 2005. Selection of smart aptamers by equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures (ECEEM). *Journal of the American Chemical Society*, 127(32), pp.11224–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16089434>.
- Dufau, I. et al., 2012. Multicellular tumor spheroid model to evaluate spatio-temporal dynamics effect of chemotherapeutics: application to the gemcitabine/CHK1 inhibitor combination in pancreatic cancer. *BMC cancer*, 12(1), p.15. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3280152&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 9, 2013].
- Dupouy, C. et al., 2008. Alpha,beta-D-CNA induced rigidity within oligonucleotides. *Organic & biomolecular chemistry*, 6(16), pp.2849–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18688476> [Accessed August 28, 2013].
- Dupouy, C. et al., 2010. Alpha,beta-D-CNA preorganization of unpaired loop moiety stabilizes DNA hairpin. *Chemical communications*, 46(28), pp.5142–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20539885> [Accessed August 28, 2013].
- Dupouy, C. et al., 2006. Watson–Crick Base-Pairing Properties of Nucleic Acid Analogues with Stereocontrolled  $\alpha$  and  $\beta$  Torsion Angles ( $\alpha,\beta$ -D-CNAs). *Angewandte Chemie*, 118(22), pp.3705–3709. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ange.200504475> [Accessed August 28, 2013].
- Ellington, A. & Szostak, J., 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. Available at: <http://www.ff.ul.pt/FCT/PTDC/BIM-MEC/0444/2012/24.pdf> [Accessed August 19, 2013].
- Ellington, A. & Szostak, J., 1992. Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature*, 355(6363), pp.850–852.
- Espelund, M., Stacy, R. & Jakobsen, K., 1990. A simple method for generating single-stranded DNA probes labeled to high activities. *Nucleic acids research*, 18(20), pp.6157–6158. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC332444/> [Accessed July 24, 2013].
- Famulok, M. & Hüttenhofer, a, 1996. In vitro selection analysis of neomycin binding RNAs with a mutagenized pool of variants of the 16S rRNA decoding region. *Biochemistry*, 35(14), pp.4265–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8605174>.
- Famulok, M. & Mayer, G., 1999. Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Current topics in microbiology and immunology*, 243, pp.123–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10453641>.

- Fehlauer, F. et al., 2006. Combined modality therapy of gemcitabine and irradiation on human glioma spheroids derived from cell lines and biopsy tissue. *Oncology reports*, 15(1), pp.97–105. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16328040>.
- Fendrick, J. et al., 1997. CA125 Phosphorylation Is Associated with Its Secretion from the WISH Human Amnion Cell Line. *Tumor Biology*, 18, pp.278–289.
- Ferreira, C.S.M. et al., 2008. DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer-antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 390(4), pp.1039–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17694298> [Accessed August 27, 2013].
- Ferreira, C.S.M., Matthews, C.S. & Missailidis, S., 2006. DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 27(6), pp.289–301. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17033199> [Accessed September 26, 2013].
- Fiegand, L.R. et al., 2012. Single-molecule studies of the lysine riboswitch reveal effector-dependent conformational dynamics of the aptamer domain. *Biochemistry*, 51(45), pp.9223–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23067368>.
- Friedrich, J. et al., 2009. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature protocols*, 4(3), pp.309–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19214182> [Accessed September 20, 2013].
- Friedrich, J., Ebner, R. & Kunz-Schughart, L., 2007. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *International Journal of Radiation Biology*, 83(11), pp.849–871. Available at: <http://www.ingentaconnect.com/content/apl/trab/2007/00000083/f0020011/art00015>.
- Gabellini, C. et al., 2009. Functional activity of CXCL8 receptors, CXCR1 and CXCR2, on human malignant melanoma progression. *European journal of cancer*, 45(14), pp.2618–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19683430> [Accessed October 9, 2013].
- Geiger, a et al., 1996. RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic acids research*, 24(6), pp.1029–36. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=145747&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gibot, L. et al., 2013. Antitumor drug delivery in multicellular spheroids by electropermeabilization. *Journal of controlled release*, 167(2), pp.138–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23385033> [Accessed September 27, 2013].

- Gold, L. et al., 1995. Diversity of oligonucleotide functions. *Annual review of biochemistry*, 64, pp.763–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7574500>.
- Goodman, T.T., Olive, P.L. & Pun, S.H., 2007. Increased nanoparticle penetration in collagenase-treated multicellular spheroids. *International journal of nanomedicine*, 2(2), pp.265–74. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2673974&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gopinath, S.C.B., 2011. Aptamers. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*.
- Green, L.S. et al., 1996. Inhibitory DNA ligands to platelet-derived growth factor B-chain. *Biochemistry*, 35(45), pp.14413–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8916928>.
- Gyllensten, U.B. & Erlich, H. a, 1988. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(20), pp.7652–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=282250&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hamm, J., 1996. Characterisation of antibody-binding RNAs selected from structurally constrained libraries. *Nucleic acids research*, 24(12), pp.2220–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=145926&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hamm, J., Alessi, D.R. & Biondi, R.M., 2002. Bi-functional, substrate mimicking RNA inhibits MSK1-mediated cAMP-response element-binding protein phosphorylation and reveals magnesium ion-dependent conformational changes of the kinase. *The Journal of biological chemistry*, 277(48), pp.45793–802. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235136> [Accessed September 9, 2013].
- Hamm, J., Huber, J. & Lührmann, R., 1997. Anti-idiotypic RNA selected with an anti-nuclear export signal antibody is actively transported in oocytes and inhibits Rev- and cap-dependent RNA export. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), pp.12839–44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24225&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hamula, C. et al., 2006. Selection and analytical applications of aptamers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(7), pp.681–691. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993606001178> [Accessed August 6, 2013].

- Hanahan, D. & Weinberg, R. a, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> [Accessed August 7, 2013].
- Hattrup, C.L. & Gendler, S.J., 2008. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annual review of physiology*, 70, pp.431–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17850209> [Accessed September 28, 2013].
- Haute Autorité de Santé, 2010. Cancer de l’ovaire. *Affection Longue Durée*, 30. Available at: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=24095709> [Accessed August 9, 2013].
- He, C.-Z. et al., 2013. Single-primer-limited amplification: a method to generate random ssDNA sub-library for aptamer selection. *Analytical biochemistry*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23711720> [Accessed June 3, 2013].
- He, W. et al., 2012. X-aptamers: a bead-based selection method for random incorporation of druglike moieties onto next-generation aptamers for enhanced binding. *Biochemistry*, 51(42), pp.8321–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23057694>.
- Heidemann, J. et al., 2003. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *The Journal of biological chemistry*, 278(10), pp.8508–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496258> [Accessed September 19, 2013].
- Heintz, A. & Odicino, F., 2006. Carcinoma of the ovary. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, pp.161–192. Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Carcinoma+of+the+Ovary#0> [Accessed September 11, 2013].
- Hermann, T. & Patel, D., 2000. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science*, 287(5454), pp.820–825. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.287.5454.820> [Accessed May 21, 2013].
- Herr, J.K. et al., 2006. Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer cells. *Analytical chemistry*, 78(9), pp.2918–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16642976>.
- Hesselberth, J. et al., 2000. In vitro selection of nucleic acids for diagnostic applications. *Journal of biotechnology*, 74(1), pp.15–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10943569>.
- Hicke, B.J. et al., 2001. Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein. *The Journal of biological chemistry*, 276(52), pp.48644–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11590140> [Accessed August 16, 2013].

- Hicke, B.J. & Stephens, A.W., 2000. Nucleic acid therapeutics Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy. *Nucleic acid therapeutics*, 106(8).
- Higuchi, R. & Ochman, H., 1989. Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, 17(14), pp.4705-4706. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC318226/> [Accessed July 24, 2013].
- Hoehlig, K. et al., 2013. A Novel C5a-neutralizing Mirror-image (L-)Aptamer Prevents Organ Failure and Improves Survival in Experimental Sepsis. *Molecular therapy*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23887360> [Accessed August 2, 2013].
- Hofmann, H.P. et al., 1997. Ni<sup>2+</sup>-binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair. *RNA*, 3(11), pp.1289-300. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1369568&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hoon, S. et al., 2011. Aptamer selection by high-throughput sequencing and informatic analysis. *BioTechniques*, 51(6), pp.413-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22150332> [Accessed July 30, 2013].
- Huang, C.-J. et al., 2010. Integrated microfluidic system for rapid screening of CRP aptamers utilizing systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). *Biosensors & bioelectronics*, 25(7), pp.1761-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20061133> [Accessed August 26, 2013].
- Huizenga, D.E. & Szostak, J.W., 1995. A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry*, 34(2), pp.656-65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7819261>.
- Hultman, T. et al., 1989. Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support. *Nucleic Acids Research*, 17(13), pp.4937-4946. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/content/17/13/4937.short> [Accessed July 25, 2013].
- Iwagawa, T. et al., 2012. Selection of RNA aptamers against mouse embryonic stem cells. *Biochimie*, 94(1), pp.250-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22085640> [Accessed August 26, 2013].
- Javaherian, S. et al., 2009. Selection of aptamers for a protein target in cell lysate and their application to protein purification. *Nucleic acids research*, 37(8), p.e62. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2677892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 5, 2013].
- Jayasena, S.D., 1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical chemistry*, 45(9), pp.1628-50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471678>.

- Jellinek, D. et al., 1994. Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor. *Biochemistry*, 33(34), pp.10450–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7520755>.
- Jenison, R.D. et al., 1994. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*, 263(5152), pp.1425–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7510417>.
- Ji, K. et al., 2013. A two-step stimulus-response cell-SELEX method to generate a DNA aptamer to recognize inflamed human aortic endothelial cells as a potential in vivo molecular probe for atherosclerosis plaque detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(21), pp.6853–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23842900> [Accessed August 5, 2013].
- Jiménez, E. et al., 2012. Generation of lung adenocarcinoma DNA aptamers for cancer studies. *PloS one*, 7(10), p.e46222. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3474832&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 23, 2013].
- Jing, M. & Bowser, M.T., 2011. A Review of Methods for Measuring Aptamer-Protein Equilibria. *Analytica chimica acta*, 686(612), pp.9–18.
- Kang, D. et al., 2012. Selection of DNA aptamers against glioblastoma cells with high affinity and specificity. *PloS one*, 7(10), p.e42731. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3462804&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 23, 2013].
- Kaufman, D. & Evans, G., 1990. Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *BioTechniques*, 9(6), pp.304–306.
- Keefe, A.D., Pai, S. & Ellington, A., 2010. Aptamers as therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(7), pp.537–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20592747> [Accessed May 21, 2013].
- Kelm, J.M. et al., 2003. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and bioengineering*, 83(2), pp.173–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12768623> [Accessed September 30, 2013].
- Khaitan, D. & Chandna, S., 2006. Differential mechanisms of radiosensitization by 2-deoxy-D-glucose in the monolayers and multicellular spheroids of a human glioma cell line. *Cancer biology & Therapy*, (September), pp.1142–1151. Available at: <http://www.landesbioscience.com/journals/5/article/2986/> [Accessed October 9, 2013].
- Khati, M., Schüman, M. & Ibrahim, J., 2003. Neutralization of infectivity of diverse R5 clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 by gp120-binding 2' F-RNA aptamers. *Journal of biochemistry*, 77(23), pp.12692–12698. Available at: <http://jvi.asm.org/content/77/23/12692.short> [Accessed October 21, 2013].

- Kim, T.-H. et al., 2010. The delivery of doxorubicin to 3-D multicellular spheroids and tumors in a murine xenograft model using tumor-penetrating triblock polymeric micelles. *Biomaterials*, 31(28), pp.7386–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20598741> [Accessed October 9, 2013].
- Kim, Y. et al., 2013. Aptamer Identification of Brain Tumor-Initiating Cells. *Cancer research*, 73(15), pp.4923–4936. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23796560> [Accessed August 5, 2013].
- King, D.J. et al., 1998. Novel combinatorial selection of phosphorothioate oligonucleotide aptamers. *Biochemistry*, 37(47), pp.16489–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9843415>.
- Klug, T.L., Bast, R.C. & Niloff, J.M., 1984. Monoclonal Antibody Immunoradiometric Assay for an Antigenic Determinant ( CA 125 ) Associated with Human Epithelial Ovarian Carcinomas Monoclonal Antibody Immunoradiometric Assay for an Antigenic. *Cancer Research*, 44, pp.1048–1053.
- Kraus, E., James, W. & Barclay, a N., 1998. Cutting edge: novel RNA ligands able to bind CD4 antigen and inhibit CD4+ T lymphocyte function. *Journal of immunology*, 160(11), pp.5209–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9605115>.
- Kubik, M.F. et al., 1994. High-affinity RNA ligands to human alpha-thrombin. *Nucleic acids research*, 22(13), pp.2619–26. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=308218&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Kui Wong, N. et al., 2003. Characterization of the oligosaccharides associated with the human ovarian tumor marker CA125. *The Journal of biological chemistry*, 278(31), pp.28619–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12734200> [Accessed September 11, 2013].
- Kunii, T. et al., 2011. Selection of DNA aptamers recognizing small cell lung cancer using living cell-SELEX. *The Analyst*, 136(7), pp.1310–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21321690> [Accessed July 23, 2013].
- Kupakuwana, G. V et al., 2011. Acyclic identification of aptamers for human alpha-thrombin using over-represented libraries and deep sequencing. *PloS one*, 6(5), p.e19395. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3098231&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 18, 2013].
- Lee, J.F. et al., 2004. Aptamer database. *Nucleic acids research*, 32(Database issue), pp.D95–100. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=308828&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 27, 2013].

- Legiewicz, M. et al., 2005. Size, constant sequences, and optimal selection. *Rna*, pp.1701–1709. Available at: <http://rnajournal.cshlp.org/content/11/11/1701.short> [Accessed August 21, 2013].
- Lemay, J. & Lafontaine, D.A., 2006. Le riborégulateur adénine Un nouveau mode de régulation génétique REVUES. *MEDECINE/SCIENCES*, 22.
- Li, C. et al., 2008. Survival advantages of multicellular spheroids vs. monolayers of HepG2 cells in vitro. *Oncology reports*, pp.1465–1471. Available at: <http://www.spandidos-publications.com/or/20/6/1465> [Accessed October 9, 2013].
- Li, J. et al., 2011. Peptide Aptamers with Biological and Therapeutic Applications. *Current medicinal chemistry*, 18(27), pp.4215–4222.
- Li, Y., Geyer, C.R. & Sen, D., 1996. Recognition of anionic porphyrins by DNA aptamers. *Biochemistry*, 35(21), pp.6911–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8639643>.
- Liang, H.-R. et al., 2012. Isolation of ssDNA aptamers that inhibit rabies virus. *International immunopharmacology*, 14(3), pp.341–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22771543> [Accessed July 23, 2013].
- Lin, Y. et al., 1996. High-affinity and specific recognition of human thyroid stimulating hormone (hTSH) by in vitro-selected 2'-amino-modified RNA. *Nucleic acids research*, 24(17), pp.3407–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146099&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Liu, J. et al., 2012. Selection of aptamers specific for adipose tissue. *PloS one*, 7(5), p.e37789. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3360593&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 23, 2013].
- Lloyd, K.O. & Yin, B.W., 2001. Synthesis and secretion of the ovarian cancer antigen CA 125 by the human cancer cell line NIH:OVCAR-3. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 22(2), pp.77–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11125279>.
- Lloyd, K.O., Yin, B.W. & Kudryashov, V., 1997. Isolation and characterization of ovarian cancer antigen CA 125 using a new monoclonal antibody (VK-8): identification as a mucin-type molecule. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 71(5), pp.842–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9180155>.
- Lobjois, V. et al., 2009. Cell cycle and apoptotic effects of SAHA are regulated by the cellular microenvironment in HCT116 multicellular tumour spheroids. *European journal of cancer*, 45(13), pp.2402–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553104> [Accessed October 9, 2013].

- Lorenz, S., Tomcin, S. & Mailänder, V., 2011. Staining of Mitochondria with Cy5-Labeled Oligonucleotides for Long-Term Microscopy Studies. *Microsc. Microanal.*, pp.440–445. Available at: [http://journals.cambridge.org/abstract\\_S1431927611000249](http://journals.cambridge.org/abstract_S1431927611000249) [Accessed October 8, 2013].
- Low, S.Y., Hill, J.E. & Peccia, J., 2009a. A DNA aptamer recognizes the Asp f 1 allergen of *Aspergillus fumigatus*. *Biochemical and biophysical research communications*, 386(3), pp.544–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2727474&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 5, 2013].
- Low, S.Y., Hill, J.E. & Peccia, J., 2009b. DNA aptamers bind specifically and selectively to (1->3)-beta-D-glucans. *Biochemical and biophysical research communications*, 378(4), pp.701–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2638985&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 5, 2013].
- Mahlknecht, G. et al., 2013. Aptamer to ErbB-2 / HER2 enhances degradation of the target and inhibits tumorigenic growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013.
- Mallikaratchy, P., Tang, Z. & Kwame, S., 2007. Aptamer directly evolved from live cells recognizes membrane bound immunoglobulin heavy mu chain in Burkitt's lymphoma cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, pp.2230–2238. Available at: <http://www.mcponline.org/content/6/12/2230.short> [Accessed August 6, 2013].
- Manimala, J.C. et al., 2004. Tuning the specificity of a synthetic receptor using a selected nucleic acid receptor. *Journal of the American Chemical Society*, 126(50), pp.16515–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15600355>.
- Mann, D. et al., 2005. In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(4), pp.1928–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289104> [Accessed September 9, 2013].
- Mannironi, C. et al., 1997. In vitro selection of dopamine RNA ligands. *Biochemistry*, 36(32), pp.9726–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9245404>.
- Mardis, E.R., 2008. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual review of genomics and human genetics*, 9, pp.387–402. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18576944> [Accessed September 17, 2013].
- Marrero, B. & Heller, R., 2012. The use of an in vitro 3D melanoma model to predict in vivo plasmid transfection using electroporation. *Biomaterials*, 33(10), pp.3036–3046. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961211015328> [Accessed October 9, 2013].

- Marrero, B., Messina, J. & Heller, R., 2009. Generation of a tumor spheroid in a microgravity environment as a 3D model of melanoma. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 45(9), pp.523–534. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11626-009-9217-2> [Accessed October 9, 2013].
- Marshall, K. & Ellington, A., 2000. in vitro selection of rna aptamers. *Methods in enzymology*, 318(1997), pp.193–214.
- Martin, J. a et al., 2013. Selection of an aptamer antidote to the anticoagulant drug bivalirudin. *PloS one*, 8(3), p.e57341. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3590194&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 12, 2013].
- Martin, L. & Schilder, R., 2007. Novel approaches in advancing the treatment of epithelial ovarian cancer: the role of angiogenesis inhibition. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(20), pp.2894–901. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17617520> [Accessed September 10, 2013].
- McManus, S. a & Li, Y., 2013. Assessing the amount of quadruplex structures present within G<sub>2</sub>-tract synthetic random-sequence DNA libraries. *PloS one*, 8(5), p.e64131. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3663748&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 23, 2013].
- Mehta, G. et al., 2012. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of controlled release*, 164(2), pp.192–204. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22613880> [Accessed September 16, 2013].
- Mellor, H.R., Ferguson, D.J.P. & Callaghan, R., 2005. A model of quiescent tumour microregions for evaluating multicellular resistance to chemotherapeutic drugs. *British journal of cancer*, 93(3), pp.302–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2361565&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 17, 2013].
- Mendonça, S.D. & Bowser, M.T., 2004a. In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *Journal of the American Chemical Society*, 126(1), pp.20–1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14709039>.
- Mendonça, S.D. & Bowser, M.T., 2005. In vitro selection of aptamers with affinity for neuropeptide Y using capillary electrophoresis. *Journal of the American Chemical Society*, 127(26), pp.9382–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15984861>.
- Mendonça, S.D. & Bowser, M.T., 2004b. In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Analytical chemistry*, 76(18), pp.5387–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15362896>.

- Mironov, A.S. et al., 2002. Sensing small molecules by nascent RNA: a mechanism to control transcription in bacteria. *Cell*, 111(5), pp.747–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12464185>.
- Misono, T.S. & Kumar, P.K.R., 2005. Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance. *Analytical biochemistry*, 342(2), pp.312–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15913532> [Accessed October 21, 2013].
- Missailidis, S. & Perkins, A., 2007. Update: aptamers as novel radiopharmaceuticals: their applications and future prospects in diagnosis and therapy. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 22(4), pp.453–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17803440> [Accessed August 27, 2013].
- Miyachi, Y. et al., 2010. Selection of DNA aptamers using atomic force microscopy. *Nucleic acids research*, 38(4), p.e21. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2831320&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 24, 2013].
- Monazzam, A. et al., 2007. Application of the multicellular tumour spheroid model to screen PET tracers for analysis of early response of chemotherapy in breast cancer. *Breast cancer research*, 9(4), p.R45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2206720&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 9, 2013].
- Monk, B. & Coleman, R., 2009. Changing the Paradigm in the Treatment of Platinum-Sensitive Recurrent Ovarian Cancer: From Platinum Doublets to Nonplatinum Doublets and Adding Antiangiogenesis Compounds. *International Journal of Gynecological Cancer*, 19(11), pp.S63–S67.
- Mosing, R.K., Mendonsa, S.D. & Bowser, M.T., 2005. Capillary electrophoresis-SELEX selection of aptamers with affinity for HIV-1 reverse transcriptase. *Analytical chemistry*, 77(19), pp.6107–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16194066>.
- Müller, J. et al., 2008. Monitoring the progression of the in vitro selection of nucleic acid aptamers by denaturing high-performance liquid chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 390(4), pp.1033–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17994225> [Accessed October 5, 2013].
- Murphy, M.B., 2003. An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification. *Nucleic Acids Research*, 31(18), p.110e–110. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gng110> [Accessed October 4, 2013].
- Nakabayashi, Y. & Nishigaki, K., 1996. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) can be explained by semistable conformation dynamics of single-stranded DNA. *Journal of biochemistry*, 325, pp.320–325. Available at: <http://jb.oxfordjournals.org/content/120/2/320.short> [Accessed October 6, 2013].

- Nakamura, K. et al., 1999. Apoptosis induction of human lung cancer cell line in multicellular heterospheroids with humanized antiganglioside GM2 monoclonal antibody. *Cancer research*, pp.5323–5330. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/59/20/5323.short> [Accessed October 9, 2013].
- Nederman, T., Norling, B. & Glimelius, B., 1984. Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer research*, pp.3090–3097. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/44/7/3090.short> [Accessed October 9, 2013].
- Niazi, J.H. et al., 2008. ssDNA aptamers that selectively bind oxytetracycline. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(3), pp.1254–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17988875> [Accessed August 7, 2013].
- Nieuwlandt, D., Wecker, M. & Gold, L., 1995. In vitro selection of RNA ligands to substance P. *Biochemistry*, 34(16), pp.5651–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7537093>.
- Nikiforov, T.T. et al., 1994. The use of phosphorothioate primers and exonuclease hydrolysis for the preparation of single-stranded PCR products and their detection by solid-phase hybridization. *PCR methods and applications*, 3(5), pp.285–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8038696>.
- Nilsson, M.B., Langley, R.R. & Fidler, I.J., 2005. Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine. *Cancer research*, 65(23), pp.10794–800. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1534114&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 23, 2013].
- Ninomiya, K. et al., 2013. Cell-SELEX based selection and characterization of DNA aptamer recognizing human hepatocarcinoma. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(6), pp.1797–802. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23403083> [Accessed May 30, 2013].
- Nitsche, A. et al., 2007. One-step selection of Vaccinia virus-binding DNA aptamers by MonoLEX. *BMC biotechnology*, 7, p.48. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1994675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 10, 2013].
- Nolte, A., Klußmann, S. & Bald, R., 1996. Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nature biotechnology* *Biotechnology*, 14. Available at: <http://www.nature.com/nbt/journal/v14/n9/abs/nbt0996-1116.html> [Accessed October 4, 2013].
- Nutiu, R. & Li, Y., 2005. In Vitro Selection of Structure-Switching Signaling Aptamers. *Angewandte Chemie*, pp.1061–1065. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ange.200461848/full> [Accessed August 14, 2013].

- O'Brien, T. et al., 2002. The CA 125 Gene: A Newly Discovered Extension of the Glycosylated N-Terminal Domain Doubles the Size of This Extracellular Superstructure. *Tumor Biology*, 23, pp.154–169.
- O'Brien, T. et al., 2001. The CA 125 Gene: An Extracellular Superstructure Dominated by Repeat Sequences. *Tumor Biology*, 22, pp.348–366.
- Oh, S. et al., 2011. Improving aptamer selection efficiency through volume dilution, magnetic concentration, and continuous washing in microfluidic channels. *Analytical Chemistry*, 83(17), pp.6883–6889. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac201269f> [Accessed July 30, 2013].
- Ohuchi, S.P., Ohtsu, T. & Nakamura, Y., 2006. Selection of RNA aptamers against recombinant transforming growth factor-beta type III receptor displayed on cell surface. *Biochimie*, 88(7), pp.897–904. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16540230> [Accessed August 16, 2013].
- Pagratis, N.C., 1996. Rapid preparation of single stranded DNA from PCR products by streptavidin induced electrophoretic mobility shift. *Nucleic acids research*, 24(18), pp.3645–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146126&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Palmai-Pallag, T. et al., 2005. The role of the SEA (sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin) module in cleavage of membrane-tethered mucins. *The FEBS journal*, 272(11), pp.2901–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15943821> [Accessed September 11, 2013].
- Pampaloni, F., Reynaud, E.G. & Stelzer, E.H.K., 2007. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(10), pp.839–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17684528>.
- Pasquet, M. et al., 2010. Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 126(9), pp.2090–101. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19739074> [Accessed July 23, 2013].
- Pastor, F. et al., 2013. CD28 aptamers as powerful immune response modulators. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 2(April), p.e98. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3696906&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 5, 2013].
- Patel, D.J. et al., 1997. Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. *Journal of molecular biology*, 272(5), pp.645–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9368648>.
- Paul, A. et al., 2009. Streptavidin-coated magnetic beads for DNA strand separation implicate a multitude of problems during cell-SELEX. *Oligonucleotides*, 19(3),

- pp.243–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732022> [Accessed June 19, 2013].
- Pestourie, C. et al., 2006. Comparison of different strategies to select aptamers against a transmembrane protein target. *Oligonucleotides*, 16(4), pp.323–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17155908>.
- Pfisterer, J. & Ledermann, J. a, 2006. Management of platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Seminars in oncology*, 33(2 Suppl 6), pp.S12–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16716798> [Accessed August 13, 2013].
- Pickl, M. & Ries, C.H., 2009. Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene*, 28(3), pp.461–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18978815> [Accessed October 9, 2013].
- Plante, M. et al., 1994. Interleukin-6 level in serum and ascites as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer. *Cancer*, 73(7), pp.1882–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8137215>.
- Plummer, K. a et al., 2005. In vitro selection of RNA aptamers against a composite small molecule-protein surface. *Nucleic acids research*, 33(17), pp.5602–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1240114&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 27, 2013].
- Prados, J. et al., 2008. Combined therapy using suicide gef gene and paclitaxel enhances growth inhibition of multicellular tumour spheroids of A-549 human lung cancer cells. *International journal of oncology*, 33(1), pp.121–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18575757>.
- Qian, J. et al., 2009. Generation of highly specific aptamers via micromagnetic selection. *Analytical chemistry*, 81(13), pp.5490–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2704263&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Raman, D. et al., 2007. Role of chemokines in tumor growth. *Cancer letters*, 256(2), pp.137–65. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2065851&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 19, 2013].
- Rancourt, C. et al., 2010. The Role of MUC16 Mucin ( CA125 ) in the Pathogenesis of Ovarian Cancer. *Ovarian Cancer - Basic Science Perspective*.
- Rao, T. & Park, K., 2010. Novel monoclonal antibodies against the proximal (carboxy-terminal) portions of MUC16. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 18(5), pp.462–472. Available at: [http://journals.lww.com/appliedimmunohist/Abstract/2010/10000/Novel\\_Monoclonal\\_Antibodies\\_Against\\_the\\_Proximal.10.aspx](http://journals.lww.com/appliedimmunohist/Abstract/2010/10000/Novel_Monoclonal_Antibodies_Against_the_Proximal.10.aspx) [Accessed September 11, 2013].

- Robertson, D. & Joyce, G., 1990. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v344/n6265/abs/344467a0.html> [Accessed August 19, 2013].
- Robertson, D.L. & Joyce, G.F., 1990. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, 344, pp.467–468.
- Ruckman, J. et al., 1998. 2'-Fluoropyrimidine RNA-based Aptamers to the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165). INHIBITION OF RECEPTOR BINDING AND VEGF-INDUCED VASCULAR PERMEABILITY THROUGH INTERACTIONS REQUIRING THE EXON 7-ENCODED DOMAIN. *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), pp.20556–20567. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.273.32.20556> [Accessed October 4, 2013].
- Ruff, K.M., Snyder, T.M. & Liu, D.R., 2010. Enhanced functional potential of nucleic acid aptamer libraries patterned to increase secondary structure. *Journal of the American Chemical Society*, 132(27), pp.9453–64. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2898215&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ruff, P., Pai, R.B. & Storici, F., 2012. Real-Time PCR-Coupled CE-SELEX for DNA Aptamer Selection. *ISRN Molecular Biology*, 2012, pp.1–9. Available at: <http://www.hindawi.com/isrn/mb/2012/939083/> [Accessed August 26, 2013].
- Rusconi, C. et al., 2002. RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. *Nature*, 419(September), pp.0–4. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v419/n6902/abs/nature00963.html> [Accessed October 4, 2013].
- Sanger, F. & Coulson, A., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), pp.441–446.
- Santini, M.T., Rainaldi, G. & Indovina, P.L., 2000. Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Critical reviews in oncology/hematology*, 36(2-3), pp.75–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11033298>.
- Sassanfar, M. & Szostak, J., 1993. An RNA motif that binds ATP. *Nature*. Available at: <http://www.its.caltech.edu/~bch176/SassanfarSzostak.pdf> [Accessed September 9, 2013].
- Sato, S. & Itamochi, H., 2012. Bevacizumab and ovarian cancer. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 24(1), pp.8–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22123222> [Accessed August 9, 2013].
- Sayer, N. et al., 2002. Structural characterization of a 2'-F-RNA aptamer that binds a HIV-1 SU glycoprotein, gp120. *Biochemical and biophysical research*

- communications*, 293(3), pp.924–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12051747>.
- Schütze, T. et al., 2010. A calibrated diversity assay for nucleic acid libraries using DiStRO--a Diversity Standard of Random Oligonucleotides. *Nucleic acids research*, 38(4), p.e23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2831324&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 3, 2013].
- Schütze, T. et al., 2011. Probing the SELEX process with next-generation sequencing. *PloS one*, 6(12), p.e29604. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3248438&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 28, 2013].
- Sefah, K. et al., 2010. DNA aptamers as molecular probes for colorectal cancer study. *PloS one*, 5(12), p.e14269. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3000811&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 11, 2013].
- Shangguan, D., Cao, Z., et al., 2007. Aptamers evolved from cultured cancer cells reveal molecular differences of cancer cells in patient samples. *Clinical chemistry*, (6), pp.1153–1158. Available at: <http://www.clinchem.org/content/53/6/1153.short> [Accessed August 26, 2013].
- Shangguan, D. et al., 2006. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(32), pp.11838–43. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1567664&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Shangguan, D. et al., 2008. Identification of liver cancer-specific aptamers using whole live cells. *Analytical chemistry*, 80(3), pp.721–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177018>.
- Shangguan, D., Tang, Z., et al., 2007. Optimization and modifications of aptamers selected from live cancer cell lines. *ChemBiochem: a European journal of chemical biology*, 8(6), pp.603–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17373017> [Accessed August 15, 2013].
- Shin, C.S. et al., 2013. Development of an in Vitro 3D Tumor Model to Study Therapeutic. *Molecular Pharmaceutics*, 10, pp.2167–2175.
- Silveira, M.H. & Orgel, L.E., 1995. PCR with detachable primers. *Nucleic acids research*, 23(6), pp.1083–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=306808&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Van Simaeys, D. et al., 2010. Study of the molecular recognition of aptamers selected through ovarian cancer cell-SELEX. *PloS one*, 5(11), p.e13770. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2967474&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 5, 2013].
- Skates, S.J. et al., 2003. Calculation of the risk of ovarian cancer from serial CA-125 values for preclinical detection in postmenopausal women. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(10 Suppl), p.206s–210s. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12743136> [Accessed September 10, 2013].
- Skov, L. & Beurskens, F., 2008. IL-8 as antibody therapeutic target in inflammatory diseases: reduction of clinical activity in palmoplantar pustulosis. *The Journal of Immunology*, 181, pp.669–679. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/181/1/669.short> [Accessed October 9, 2013].
- Stoltenburg, R., Nikolaus, N. & Strehlitz, B., 2012. Capture-SELEX: Selection of DNA Aptamers for Aminoglycoside Antibiotics. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2012, p.415697. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3544269&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 23, 2013].
- Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B., 2005. FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 383(1), pp.83–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16052344> [Accessed May 22, 2013].
- Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B., 2007. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular engineering*, 24(4), pp.381–403. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627883> [Accessed August 6, 2013].
- Sussman, D., Nix, J. & Wilson, C., 2000. The structural basis for molecular recognition by the vitamin B 12 RNA aptamer. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7(1), pp.53–57. Available at: [http://www.nature.com/nsmb/journal/v7/n1/abs/nsb0100\\_53.html](http://www.nature.com/nsmb/journal/v7/n1/abs/nsb0100_53.html) [Accessed September 9, 2013].
- Sutherland, R., 1988. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science*. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/240/4849/177.short> [Accessed October 9, 2013].
- Sutherland, R.M., McCredie, J. a & Inch, W.R., 1971. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 46(1), pp.113–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5101993>.
- Svobodová, M. et al., 2012. Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404(3), pp.835–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22733247> [Accessed May 24, 2013].

- Tang, J. et al., 2006. The DNA aptamers that specifically recognize ricin toxin are selected by two in vitro selection methods. *Electrophoresis*, 27(7), pp.1303–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16518777> [Accessed October 4, 2013].
- Tasset, D.M., Kubik, M.F. & Steiner, W., 1997. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *Journal of molecular biology*, 272(5), pp.688–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9368651>.
- Teoh, D. & Secord, A.A., 2012. Antiangiogenic agents in combination with chemotherapy for the treatment of epithelial ovarian cancer. *International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society*, 22(3), pp.348–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22266932> [Accessed August 13, 2013].
- Thériault, C. et al., 2011. MUC16 (CA125) regulates epithelial ovarian cancer cell growth, tumorigenesis and metastasis. *Gynecologic oncology*, 121(3), pp.434–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21421261> [Accessed September 19, 2013].
- Thiel, W.H. et al., 2011. Nucleotide bias observed with a short SELEX RNA aptamer library. *Nucleic acid therapeutics*, 21(4), pp.253–63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3198618&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 22, 2013].
- Thiel, W.H. et al., 2012. Rapid identification of cell-specific, internalizing RNA aptamers with bioinformatics analyses of a cell-based aptamer selection. *PLoS one*, 7(9), p.e43836. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3433472&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 30, 2013].
- Truchet, I. et al., 2008. Estrogen and antiestrogen-dependent regulation of breast cancer cell proliferation in multicellular spheroids: Influence of cell microenvironment. *International journal of oncology*, 32(5), pp.1033–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425329>.
- Tuerk, C. & Gold, L., 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249(4968), pp.505–510. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/249/4968/505.short> [Accessed August 19, 2013].
- Turgeon, R. & Bowser, M., 2009. Micro free-flow electrophoresis: theory and applications. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 394(1), pp.187–198. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00216-009-2656-5> [Accessed August 26, 2013].
- Turgeon, R. & Fonslow, B., 2010. Measuring aptamer equilibria using gradient micro free flow electrophoresis. *Analytical chemistry*, 82(9), pp.3636–3641. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac902877v> [Accessed August 26, 2013].

- Valcárcel, M. et al., 2008. Three-dimensional growth as multicellular spheroid activates the proangiogenic phenotype of colorectal carcinoma cells via LFA-1-dependent VEGF: implications on hepatic micrometastasis. *Journal of translational medicine*, 6, p.57. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2579286&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 30, 2013].
- Vergote, I., Borner, O. & Abeler, V., 1987. Evaluation of serum CA 125 levels in the monitoring of ovarian cancer. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 157(1), pp.88–92.
- Vitreschak, A.G. et al., 2004. Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends in genetics: TIG*, 20(1), pp.44–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14698618> [Accessed September 30, 2013].
- Vivekananda, J. & Kiel, J.L., 2006. Anti-Francisella tularensis DNA aptamers detect tularemia antigen from different subspecies by Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 86(6), pp.610–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16550191> [Accessed August 27, 2013].
- Walder, R., Hayes, J. & JA, W., 1993. Use of PCR primers containing a 3' terminal ribose residue to prevent cross-contamination of amplified sequences. *Nucleic Acids Research*, 21(18), pp.4339–4343.
- Walter, J.-G., Stahl, F. & Scheper, T., 2012. Aptamers as affinity ligands for downstream processing. *Engineering in Life Sciences*, 12(5), pp.496–506. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.201100197> [Accessed August 5, 2013].
- Wang, C. et al., 2009. In vitro selection of high-affinity DNA aptamers for streptavidin. *Acta biochimica et biophysica sinica*, 41(4), pp.335–340. Available at: <http://abbs.oxfordjournals.org/content/41/4/335.short> [Accessed August 13, 2013].
- Wang, C. et al., 2003. Single-stranded DNA aptamers that bind differentiated but not parental cells: subtractive systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Journal of Biotechnology*, 102(1), pp.15–22. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165602003607> [Accessed June 6, 2013].
- Wang, R. et al., 2005. Three-dimensional co-culture models to study prostate cancer growth, progression, and metastasis to bone. *Seminars in cancer biology*, 15(5), pp.353–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15982899> [Accessed October 2, 2013].
- Wang, T. & Ray, J., 2012. Aptamer-based molecular imaging. *Protein & cell*, 3(10), pp.739–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983904> [Accessed August 13, 2013].

- Wasungu, L. et al., 2009. A 3D in vitro spheroid model as a way to study the mechanisms of electroporation. *International journal of pharmaceuticals*, 379(2), pp.278–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19716035> [Accessed October 9, 2013].
- Waugh, D.J.J. & Wilson, C., 2008. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical cancer research*, 14(21), pp.6735–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18980965> [Accessed September 19, 2013].
- Whiteside, T., 2008. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, pp.5904–5912. Available at: <http://www.nature.com/onc/journal/v27/n45/abs/onc2008271a.html> [Accessed September 19, 2013].
- Williams, K., 1997. Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(October), pp.11285–11290. Available at: <http://www.pnas.org/content/94/21/11285.short> [Accessed October 4, 2013].
- Williams, K.P. & Bartel, D.P., 1995. PCR product with strands of unequal length. *Nucleic acids research*, 23(20), pp.4220–1. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=307365&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wilson, W. & Szostak, J.W., 1998. Isolation of a fluorophore-specific redox activity DNA aptamer with weak. *Chemistry & biology*, 5, pp.609–617.
- Winkler, W., Nahvi, A. & Breaker, R.R., 2002. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*, 419(6910), pp.952–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12410317>.
- Wu, S. et al., 2012. Modulation of CXCL-8 expression in human melanoma cells regulates tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis. *Cancer medicine*, 1(3), pp.306–17. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3544458&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 19, 2013].
- Xie, K., 2001. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine & growth factor reviews*, 12(4), pp.375–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544106>.
- Xu, Y. et al., 2009. Aptamer-based microfluidic device for enrichment, sorting, and detection of multiple cancer cells. *Analytical chemistry*, 81(17), pp.7436–42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3164879&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Yang, Q. et al., 1998. DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(10), pp.5462–7. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=20399&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Yin, B., Dnistrian, A. & Lloyd, K., 2002. Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *International Journal of Cancer*, 98, pp.737–740. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.10250/full> [Accessed September 11, 2013].
- Yin, B.W. & Lloyd, K.O., 2001. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *The Journal of biological chemistry*, 276(29), pp.27371–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369781> [Accessed August 6, 2013].
- Yoshimura, T., 1987. chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1. *The Journal of Immunology*, 139(3), pp.788–793. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/139/3/788.short> [Accessed October 9, 2013].
- Zhang, K. et al., 2012. A novel aptamer developed for breast cancer cell internalization. *ChemMedChem*, 7(1), pp.79–84. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.201100457/full> [Accessed July 23, 2013].
- Zhou, J., Battig, M.R. & Wang, Y., 2010. Aptamer-based molecular recognition for biosensor development. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(6), pp.2471–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20644915> [Accessed August 27, 2013].
- Zichi, D. et al., 2011. METHOD FOR GENERATING APTAMERS WITH IMPROVED OFF RATES. *United States Patent n° US 007947447 B2*.
- Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), pp.3406–3415. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkg595> [Accessed August 9, 2013].





Les aptamères ADN sont des séquences simple-brins capables de se lier spécifiquement à une cible. Ils constituent de nouveaux outils pour la détection et/ou l'inhibition de molécules biologiques. Ce travail s'inscrit dans le cadre du diagnostic et de la thérapie du cancer ovarien.

Les cibles sélectionnées dans ce contexte sont les interleukines humaines IL-6 et IL-8 dans le but d'inhiber leurs effets angiogéniques, et le biomarqueur du cancer épithélial ovarien Mucine16 sous sa forme sécrétée (CA 125) et membranaire (Mucine16) dans le but de faire du diagnostic sanguin et cellulaire.

Sélections IL-6 et IL-8 : Des séquences ont été sélectionnées par Filter-Binding SELEX.

Sélection Mucine16 : Les cellules cancéreuses ovariennes présentent pour la plupart la particularité de surexprimer les deux formes de cette protéine. Ce qui en fait le candidat pour le ciblage des tumeurs. Des séquences ont été identifiées après 20 cycles de Cell-SELEX.

D'autre part, nous avons comparé le marquage fluorescent de sphéroïdes MCF-7 par un anticorps anti-Mucine1 et un aptamère anti-Mucine1. L'aptamère montre une pénétration plus profonde dans le sphéroïde ainsi qu'une internalisation.

DNA Aptamers are single-stranded sequences able to specifically bind a target molecule. They constitute new tools for the detection and/or the inhibition of biological molecules. This work is in the field of ovarian cancer diagnostic and therapy.

In this concept, selected targets are the human interleukins IL-6 and IL-8 for inhibiting their angiogenic effect and the epithelial ovarian cancer biomarker Mucine16 on its secreted (CA 125) and membranal (Mucine16) forms in the aim of doing blood and cellular diagnostic.

IL-6 and IL-8 selections: Sequences have been selected by Filter-Binding SELEX.

Mucine16 selection: Most of ovarian cancer cells overexpress the two forms of this protein. That is why Mucine16 is a candidate for tumor targeting. Sequences have been identified after 20 cycles of Cell-SELEX.

In addition, we compared the fluorescent labeling of MCF-7 spheroids by an anti-Mucine1 antibody and its DNA aptamer analog. The aptamer exhibits a deeper spheroid penetration and is internalized.