

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

DÉVELOPPEMENT D'UNE PLATEFORME ÉLECTROCHIMIQUE À BASE  
D'APTAMÈRE POUR LA BIODÉTECTION DE LA DEXAMÉTHASONE  
DANS L'EAU

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

SOMIA MEHENNAOUI

DÉCEMBRE 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»



## REMERCIEMENTS

Au terme de ce modeste travail, je remercie tout d'abord le Bon Dieu qui m'a donné la force, la volonté et le courage pour terminer ce travail de recherche.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mon directeur de recherche, Mohamed Siaj, qui a supervisé mon travail tout en me laissant une grande marge de liberté. Je le remercie pour son soutien, sa patience, sa disponibilité, ses suggestions et ses encouragements pour mener à bien ce travail.

Je remercie également les professeurs Marc André Gauthier de l'INRS, Borhane Annabi et Steve Bourgault du département de chimie et biochimie de l'UQÀM de m'avoir donné l'accès à leurs laboratoires.

Un énorme remerciement à ma chère maman, qui grâce à ses encouragements et ses grands sacrifices, a pu créer le climat propice à la poursuite de mes études.

Ma plus profonde reconnaissance à la faculté des sciences de l'UQÀM pour la bourse d'exemption et à la Fondation de l'UQÀM pour la bourse d'excellence FARE que j'ai reçues au cours de mes études de maîtrise.

J'exprime enfin mes plus vifs remerciements aux membres du groupe de professeur Siaj, et en particulier Dr. Sujittra Poorahong pour son aide en électrochimie, mes collègues Gaston Contreras et Farzaneh Mahvash, ainsi que tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce projet.



## DÉDICACE

*À la mémoire de mon père. En espérant qu'il sera toujours fier de moi ...*

*À ma chère maman. Si je suis ici aujourd'hui, c'est grâce à toi ...*



## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX . . . . .	ix
LISTE DES FIGURES . . . . .	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES . . . . .	xiii
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS . . . . .	xv
RÉSUMÉ . . . . .	xvii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION . . . . .	1
1.1 Les contaminants pharmaceutiques . . . . .	3
1.2 Les composés hormonaux et la dexaméthasone . . . . .	4
1.3 L'utilisation de la dexaméthasone . . . . .	5
1.4 Les effets de la dexaméthasone . . . . .	7
1.5 Les méthodes de détection des contaminants hormonaux dans l'eau . . . . .	8
1.6 Organisation et contribution du mémoire . . . . .	10
CHAPITRE II	
GÉNÉRALITÉS SUR LES BIOCAPTEURS . . . . .	13
2.1 Définition d'un biocapteur . . . . .	13
2.2 Historique . . . . .	15
2.3 Classification des biocapteurs . . . . .	17
2.3.1 Classification selon le type du biorécepteur (Ligand) . . . . .	18
2.3.1.1 Les anticorps . . . . .	18
2.3.1.2 Les micro-organismes et les cellules biologiques . . . . .	19
2.3.1.3 Les enzymes . . . . .	20
2.3.1.4 Les aptamères . . . . .	20
2.3.2 Classification selon la plateforme de détection . . . . .	22
2.3.2.1 Les plateformes piézoélectriques . . . . .	22

2.3.2.2	Les plateformes manométriques . . . . .	23
2.3.2.3	Les plateformes thermiques . . . . .	24
2.3.2.4	Les plateformes optiques . . . . .	24
2.3.2.5	Les plateformes électrochimiques . . . . .	29
2.4	Conclusion . . . . .	34
CHAPITRE III		
PARTIE EXPÉRIMENTALE . . . . .		
3.1	Sélection des aptamères . . . . .	37
3.1.1	Sélection <i>in vitro</i> des aptamères par SELEX . . . . .	38
3.1.1.1	Incubation des aptamères avec les perles de DXN sépharose 6 $\beta$ . . . . .	40
3.1.1.2	Lavage . . . . .	41
3.1.1.3	Élution . . . . .	41
3.1.1.4	Élimination des sels et amplification par PCR de l'ADNsb élué . . . . .	41
3.1.1.5	Dénaturation de l'ADN double brin à partir de produits de PCR par le gel de polyacrylamide . . . . .	43
3.1.2	Clonage . . . . .	44
3.1.3	Purification et Séquençage . . . . .	45
3.2	Caractérisation des aptamères obtenus . . . . .	46
3.2.1	Détermination de l'affinité des aptamères et leur constante de dissociation . . . . .	46
3.2.2	Étude de la réactivité croisée par Fluorescence . . . . .	48
3.2.3	Étude du changement conformationnel des aptamères avant et après la liaison à la DXN . . . . .	49
3.3	Application électrochimique de l'aptamère sélectionné à la DXN . . . . .	51
3.3.1	Préparation des électrodes et immobilisation des aptamères . . . . .	51
3.3.2	Incubation de la DXN . . . . .	52
3.3.3	Optimisation du temps d'incubation de DEX04 et DXN . . . . .	53

3.3.4	Instrumentation et mesures électrochimiques . . . . .	53
3.4	Conclusion . . . . .	54
CHAPITRE IV		
RÉSULTATS ET DISCUSSION . . . . .		55
4.1	Sélection des aptamères . . . . .	55
4.1.1	Sélection <i>in vitro</i> des aptamères par SELEX . . . . .	55
4.1.2	Clonage et séquençage . . . . .	58
4.1.3	Structure secondaire des séquences qui ont montré une bonne affinité à la DXN . . . . .	59
4.2	Caractérisation des aptamères obtenus . . . . .	61
4.2.1	Détermination de la constante de dissociation $kd$ et l'affinité des aptamères par fluorescence . . . . .	61
4.2.2	Détermination de la spécificité et de la réactivité croisée des aptamères . . . . .	62
4.2.3	Changement conformationnel des aptamères avant et après la liaison . . . . .	64
4.3	Application électrochimique de l'aptamère développé pour la biodétection de la DXN . . . . .	66
4.4	Optimisation de temps d'incubation sur l'aptacapteur . . . . .	72
4.5	Étude de la spécificité de l'aptacapteur à la DXN . . . . .	73
4.6	Analyse des échantillons réels . . . . .	75
4.7	Conclusion . . . . .	76
CHAPITRE V		
CONCLUSION ET PERSPECTIVES . . . . .		77
RÉFÉRENCES . . . . .		79



## LISTE DES TABLEAUX

2.1	Domaines d'application des biocapteurs. . . . .	16
4.1	Les séquences d'aptamère sélectionnées contre la DXN. . . . .	59
4.2	Valeurs de la constante de dissociation $Kd$ des six séquences. . . .	62
4.3	Pourcentage de récupération de DXN dans des échantillons d'eau.	75



## LISTE DES FIGURES

1.1	Structure chimique de la Dexaméthasone (DXN). . . . .	5
2.1	Structure schématique et principe de fonctionnement d'un biocapteur. . . . .	14
2.2	Schéma descriptif du fonctionnement d'un biocapteur piézoélectrique de cristal de quartz Liss <i>et al.</i> (2002). . . . .	23
2.3	Combinaison d'aptamères avec des molécules fluophores et des molécules inhibitrices (Song <i>et al.</i> , 2008). . . . .	26
2.4	Principe du Biacore basé sur la variation d'angle du pic d'absorption. . . . .	28
2.5	Les différents modes de détection électrochimique (Jarrar, 2011) . . . . .	30
3.1	Schéma de diagramme général de la technique SELEX. . . . .	39
3.2	Schéma de la structure des perles de DXN sépharose 6 $\beta$ . . . . .	40
3.3	Différentes étapes de clonage des aptamères. . . . .	45
3.4	Différentes structures des analytes utilisés pour déterminer la réactivité croisée des aptamères. . . . .	48
3.5	Changement de conformation d'un aptamère avant la liaison avec l'analyte (A) et après la liaison (B) (Bishop <i>et al.</i> , 2007). . . . .	50
3.6	Mécanisme de la plateforme électrochimique pour la biodétection de la DXN. . . . .	52

4.1	Enrichissement des aptamères spécifiques à la DXN par SELEX. . . . .	57
4.2	Représentation schématique des structures secondaires des six aptamères sélectionnés contre la DXN. . . . .	60
4.3	Détermination de la constante d'affinité $Kd$ de la liaison des aptamères avec la DXN par fluorescence. . . . .	61
4.4	Étude de la réactivité croisée des séquences DEX 01, DEX 03, DEX 04 et DEX 10 par fluorescence. . . . .	63
4.5	Spectres de dichroïsme circulaire de DEX 01 (A), DEX 03 (B), DEX 04 (C), DEX 10 (D), DEX 05 (E) et DEX 06 (F) avant et après liaison à la DXN. . . . .	65
4.6	Voltammogrammes cycliques de 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ couple redox dans du PBS 10 mM (pH 7,4). Électrode (Au) nue (courbe noir), Au/MCH (rouge), Au/Apt/MCH (bleu) et après la liaison avec 100 nM DXN (vert). La CV a été effectué à une vitesse de balayage de 100 mV/s. . . . .	68
4.7	Parcelles de Nyquist pour les mesures d'EIS en utilisant les mêmes paramètres que dans la CV. . . . .	69
4.8	Courbe d'étalonnage correspondant à $(R_{et}-R_0)/R_0$ % par rapport à la concentration de DXN (nM). . . . .	70
4.9	Courbe de calibration pour déterminer la limite de détection de l'aptacapteur envers la DXN. . . . .	71

4.10 Effet de temps d'incubation de DXN sur la réponse de l'aptacapteur envers 50 nM DXN dans 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ , 10 mM PBS (pH 7,4). . . . .	73
4.11 La réponse de l'aptacapteur $\Delta R/R_0$ % contre le tampon BB, 20 nM de DXN, P4, NET, E2 et le mélange des DXN avec les composés interférents. . . . .	74



## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ADNsb</b>	Acide DésoxyriboNucléique simple brin
<b>Ag/AgCl</b>	Chlorure d'argent
<b>APS</b>	Persulfate d'ammonium
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>Au</b>	Électrode de travail en or.
<b>BB</b>	Binding ou buffer ou tampon de liaison
<b>Bp</b>	Paire de bases
<b>CD</b>	Dichroïsme circulaire
<b>CV</b>	Voltamétrie cyclique
<b>DADPA</b>	Daminodipropylamine agarose
<b>DXN</b>	Dexaméthasone
<b>E2</b>	Estradiol
<b>EB</b>	Elution buffer ou tampon d'élution
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
<b>GC/MS</b>	Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
<b>HPLC</b>	Chromatographie Liquide à Haute Performance
<b>IRA</b>	Radio Immuno Assay
<b>Kd</b>	Constante de Dissociation
<b>LC/MS</b>	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
<b>LH</b>	Hormone lutéinisante
<b>LOC</b>	Lab On a Chip
<b>LOD</b>	Limite de détection

<b>M</b>	Molaire
<b>MCH</b>	6Mércapto-1hexanol
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de magnésium
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium
<b>Net</b>	Noréthistérone
<b>P4</b>	Progestérone
<b>PAGE</b>	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
<b>PBS</b>	Tampon phosphate salin
<b>PCR</b>	Réaction Chaine Polymérase
<b>PHACS</b>	Composés pharmaceutiquement actifs
<b>RCT</b>	Résistance de transfert de charge
<b>Rs</b>	Résistance de la solution
<b>SAM</b>	Self-assembled monolayer
<b>SELEX</b>	Enrichissement Systématique de Ligands par Amplification Exponentielle
<b>SIE</b>	Spéctroscopie d'impédance électrochimique.
<b>SN</b>	Sélection négative
<b>SPR</b>	Résonance plasmonique de surface
<b>UE</b>	Union européenne
<b>uTAS</b>	microsystèmes d'analyse totale
<b>Zw</b>	Warburg impedance

## LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

<b>C</b>	Concentration (M ou g/l)
<b>E</b>	Potentiel (V)
<b>K<sub>d</sub></b>	Constante de dissociation ( <i>M</i> )
<b>P</b>	Poids (g, mg, $\mu$ g)
<b>R</b>	Résistance ( $\Omega$ )
<b>SI</b>	Longueur d'onde (m)
<b>T</b>	Température ( $^{\circ}$ C)
<b>t</b>	Temps (min)
<b>V</b>	Fréquence (Hz)
<b>v</b>	Volume (L ou $m^3$ )
<b>Z</b>	Impédance ( $\Omega$ )
$\Theta$	Ellipticité (mdeg)
<i>v</i>	Vitesse de balayage (V/s)
<b>M</b>	Mole
<b>g/l</b>	Gramme/Litre
<b>V</b>	Volt
<b>g</b>	Gramme
<b>mg</b>	Milligramme
$\mu$ g	Microgramme
$\Omega$	Ohms
<b>m</b>	mètre
$^{\circ}$ C	Degré Celsius
<b>min</b>	Minute

xx

**Hz**      Hertz

**L**        Litre

**mdeg**    Millidegré

**V/s**      Vitesse par seconde

## RÉSUMÉ

La dexaméthasone (DXN) est une hormone glucocorticoïde synthétique utilisée principalement comme un agent anti-inflammatoire, anti-allergique et immunosuppresseur. Elle est largement utilisée comme agent stimulant la croissance et le développement musculaire dans les bétails et l'élevage des animaux. Cette hormone est rajoutée dans certains médicaments utilisés pour le dopage et l'amélioration de la performance sportive et le gain de poids. Malgré sa large utilisation, les caractéristiques de la dexaméthasone font d'elle un perturbateur endocrinien. Son interférence avec le système endocrinien peut entraîner des effets indésirables sur la reproduction, la croissance, le développement, le comportement et l'humeur.

La présence de la dexaméthasone dans les eaux et les produits alimentaires avec des concentrations élevées nécessite un suivi et une surveillance précoces. La mise au point d'une méthode de détection simple, rapide, sensible et sélective pour cette hormone est d'une grande importance dans la recherche médicale, les analyses alimentaires et environnementales. Les biocapteurs constituent une alternative très intéressante par rapport aux autres instruments classiques de détection en raison de leur petite taille, leur facilité d'utilisation et leur faible coût. Ce sont des dispositifs analytiques conçus pour transformer un phénomène biochimique en un signal mesurable.

Dans le but de pallier les limites des méthodes de détection existantes, nous présentons dans le cadre de ce mémoire de maîtrise un biocapteur impédimétrique à base d'aptamères pour la détection de la dexaméthasone dans les eaux. L'aptamère proposé a été développé en utilisant la sélection *in vitro* dans 19 cycles. L'aptamère proposé est le premier à être développé pour la détection de la dexaméthasone. Outre son faible coût de production et sa simplicité d'utilisation, l'aptacapteur développé offre une limite de détection très faible comparativement à la majorité des instruments analytiques existants. L'efficacité de cet aptacapteur est démontrée par une étude empirique sur différents échantillons d'eau contaminée par la dexaméthasone.

**Mots clés :** Biosenseurs, Dexaméthasone, Aptamères, Perturbateurs endocriniens, Biocapteurs impédimétriques, Aptacapteurs.



## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

La pollution de l'environnement aquatique est une réalité très présente de nos jours, et ce, sous différentes formes. Elle consiste à une dégradation physique, chimique, biologique ou bactériologique des qualités naturelles du milieu aquatique. Ces modifications sont souvent provoquées par l'être humain et ses activités. Les sources de cette pollution sont nombreuses et leur identification demeure une tâche complexe. Ceci est d'une part expliqué par la multitude des substances polluantes et d'autre part la complexité des effets qu'elles engendrent sur les écosystèmes aquatiques et les organismes vivants. D'une manière générale, la pollution a pour origines principales, l'activité humaine, l'industrie, l'agriculture et les déchets domestiques . . . etc. Ces derniers perturbent les conditions de vie de la flore et de la faune aquatique, qui à son tour peut engendrer des effets néfastes pouvant aller jusqu'à l'extinction des espèces, la destruction de l'habitat naturel et la détérioration de la qualité des écosystèmes.

Au cours des dernières années, l'étude des effets toxiques des produits pharmaceutiques, un important groupe de contaminants émergents, a attiré une attention croissante dans les milieux académiques et industriels (Gros *et al.*, 2006; López-Serna *et al.*, 2013; Pérez et Barceló, 2007). La consommation de ces produits ne cesse d'augmenter de nos jours, en raison de la population en expansion, la dé-

couverte de nouveaux médicaments et l'inversion de la structure d'âge dans la population générale (Daughton, 2003). Selon l'Union européenne (UE), environ 3000 différents composés pharmaceutiquement actifs (PHACS) sont admis pour une utilisation médicale (da Silva *et al.*, 2011). Bien que les effets des produits pharmaceutiques soient bien étudiés en toxicologie, les impacts environnementaux potentiels de leur production et utilisation demeurent moins compris. Ceci explique l'intérêt croissant que portent les institutions académiques à leur investigation (da Silva *et al.*, 2011).

Les produits pharmaceutiques sont généralement utilisés en médecine humaine et vétérinaire. Ils peuvent se trouver dans l'environnement aquatique en tant que composés et métabolites ou conjugués des deux composants. Parfois, ces composés ne sont pas gérés correctement et sont rejetés directement dans les cours d'eau et les égouts. D'autres fois, ils ne sont pas complètement métabolisés par le corps humain et sont ainsi excrétés dans l'urine et les selles. Ainsi, l'apparition de ces produits pharmaceutiques dans l'environnement soulève plusieurs questions quant à leur activité biologique sur les êtres vivants (la flore, la faune et les humains). En réalité, le comportement des résidus pharmaceutiques dans l'environnement aquatique et leurs effets à long terme ne sont pas bien connus (López-Serna *et al.*, 2010). Par ailleurs, la combinaison de médicaments qui partagent un mécanisme d'action commun provoque généralement un effet synergique toxique. De même, la présence des produits pharmaceutiques dans les eaux, et en particulier dans l'eau potable et les eaux premières utilisées en industrie, devrait être considérée comme une question importante en matière de sécurité pour la santé humaine (Gros *et al.*, 2012). Par conséquent, il est nécessaire de déterminer et de surveiller les concentrations ainsi que l'apparition de produits pharmaceutiques dans les eaux (Mompelat *et al.*, 2009).

Les substances pharmaceutiques sont considérées comme des contaminants aquatiques relativement nouveaux. Les connaissances et les informations sur la concentration, le devenir et les effets de ces substances restent limités. Par conséquent, les effets de ces substances ne sont pas encore considérés dans toutes les réglementations environnementales. Toutefois, des recherches ont été effectuées dans la dernière décennie dans le but de détecter leur présence dans l'environnement et principalement dans les milieux aquatiques (Grujić *et al.*, 2009; Jelic *et al.*, 2011; López-Serna *et al.*, 2012). Les concentrations des composés pharmaceutiques individuels dans les eaux sont typiquement dans la gamme de plusieurs dizaines à des centaines de ng/L, alors que pour certains composés bien spécifiques, les concentrations peuvent être au niveau de  $\mu\text{g/L}$  (Kolpin *et al.*, 2002). Ces concentrations sont généralement trop faibles pour présenter un risque aigu pour les êtres vivants. Cependant, il est encore impossible de savoir si les organismes aquatiques sont sensibles à ces substances. De nos jours, peu de cas ont été rapportés où les produits pharmaceutiques ont été détectés à des niveaux de traces dans l'eau potable (Heberer, 2002; Stolker *et al.*, 2004; Hummel *et al.*, 2006). Ceci est principalement expliqué par l'élimination partielle de ces substances au cours du traitement des eaux. En outre, l'évaluation des risques environnementaux liés aux contaminants pharmaceutiques est souvent réalisée pour un composé pharmaceutique individuel (ingrédient actif) en isolation, alors que les composés pharmaceutiques sont généralement détectés dans des mélanges avec d'autres contaminants anthropiques (Kolpin *et al.*, 2002).

### 1.1 Les contaminants pharmaceutiques

Les substances pharmaceutiques sont classées sous différents groupes dont les antidépresseurs, les antiseptiques, les pilules contraceptives, les anti-inflammatoires, les médicaments contre le cholestérol, l'hypertension, diverses hormones, produits cytostatiques utilisés en chimiothérapie, agents de contraste en imagerie médical

... etc. Globalement, toutes les substances trouvées dans les pharmacies peuvent potentiellement se retrouver dans les eaux. Parmi celles-ci figurent les hormones qui causent des effets néfastes sur les organismes en raison de leur interférence avec le fonctionnement du système endocrinien.

## 1.2 Les composés hormonaux et la dexaméthasone

Les composés hormonaux peuvent se trouver dans les eaux suite à leur élimination dans les urines et les selles des humains et des animaux. Elles proviennent également des déchets des usines chimiques et des entreprises pharmaceutiques qui les traitent. De même, cette contamination vient des rejets des eaux usées par les établissements de santé, contenant des résidus de médicaments et des hormones non utilisés. Une telle contamination provient même des élevages industriels considérés comme de grands consommateurs de produits hormonaux. Ces derniers produisent de très grandes quantités de matières fécales et d'urine contaminant directement ou indirectement les sols par épandage.

Parmi les composés hormonaux, on trouve la Dexaméthasone (DXN), qui est une hormone synthétique appartenant au groupe de médicaments appelés corticostéroïdes. C'est une hormone glucocorticoïde dont la formule chimique, telle que illustrée par la figure 1.1 est " $C_{22}H_{29}FO_5$ ". Cette hormone est utilisée principalement comme un agent anti-inflammatoire, anti-allergique et immunosuppresseur. Elle joue le même rôle et a les mêmes effets que la cortisone qui est une hormone naturelle produite par les glandes surrénales (Li *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013).

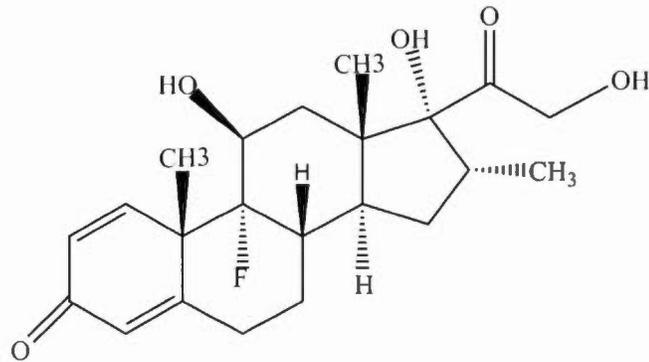


Figure 1.1: Structure chimique de la Dexaméthasone (DXN). 9-fluoro-11  $\beta$ , 17,21-trihydroxy-16  $\alpha$  méthylprégna-1,4-diène-3,20-dione.

### 1.3 L'utilisation de la dexaméthasone

La DXN est généralement utilisée pour traiter une grande variété de pathologies (Durie, 2006). On cite principalement :

- Quelques troubles endocriniens dont l'hypocorticisme ou hyperplasie surrénale causés par une sécrétion insuffisante des stéroïdes par les glandes surrénales.
- L'inflammation de la glande thyroïde (la thyroïdite).
- L'hypercalcémie (le taux de calcium anormalement élevé provoqué par le cancer).
- Les pathologies articulaires et rhumatismales ou du collagène, dont différentes variantes d'arthrite, de spondylarthrite ankylosante (inflammation des articulations sacro-iliaques ou de la colonne vertébrale), la sclérodermie et le lupus érythémateux disséminé (LED).
- Des problèmes dermatologiques comme les érythèmes, les rougeurs, les mycoses fongiques et les démangeaisons de la peau.

- Les maladies allergiques reliées à l'asthme, à l'eczéma, à l'hypersensibilité, aux allergies saisonnières et apériodiques.
- Les troubles ophtalmiques dont un certain nombre de conditions provoquant des rougeurs, des tuméfactions et l'inflammation des yeux et du contour des yeux.
- Les affections gastro-intestinales comme l'entérite (inflammation de l'intestin grêle) et la colite qui est une inflammation du gros intestin.
- Les troubles respiratoires dont l'asthme, la bronchopneumopathie, certains types de pneumonie et la sarcoïdose.
- Les troubles hématologiques dont certains cas d'anémie, le purpura qui consiste à l'extravasation de sang à l'extérieur des capillaires de la peau et la thrombocytopénie causée par la baisse du nombre de plaquettes sanguines.
- Les maladies néoplasiques ou les tumeurs y compris certains types de leucémies, de lymphomes et de myélomes.

De même, la DXN peut servir à remplacer la cortisone chez les personnes atteintes d'une insuffisance surrénale (déficientes en cortisone) ou encore pour la terminaison de la grossesse chez le chien.

La DXN est aussi largement utilisée dans l'élevage des animaux comme agents favorisant la croissance et le développement musculaire pour un intérêt économique (Goyal *et al.*, 2010; Huetos *et al.*, 1999; Wu et Lv, 2007). Cette utilisation est extrêmement toxique et nocif pour la santé humaine à cause des résidus des hormones dans la viande et d'autres produits d'origine animale (Reig *et al.*, 2006; Cherlet *et al.*, 2004). Par ailleurs, malgré son interdiction par le comité international olympique (CIO) et l'agence mondiale antidopage (AMA), la DXN est

ajoutée dans certains médicaments utilisés comme agent de dopage pour améliorer la performance sportive et le gain de poids (Goyal *et al.*, 2009).

#### 1.4 Les effets de la dexaméthasone

À cause de sa large utilisation, une grande partie de la DXN utilisée et non utilisée va aboutir dans les cours d'eau et dans les égouts. Ceci engendre des effets secondaires sur le fonctionnement des écosystèmes ainsi que sur les êtres vivants. Dans une étude effectuée par Van der Linden *et al.* (2008), l'évaluation des échantillons d'eau en utilisant le dosage biologique CALUX (*Chemical Activated Luciferase gene eXpression*) a identifié des concentrations de DXN allant de 0,39 à 1,3 ng/L dans l'eau de surface et de 11 à 243 ng/L dans les effluents municipaux, des industries, des hôpitaux et dans les eaux usées des usines de traitement. Récemment, la DXN a été détectée dans l'eau de rivière recueillie en aval d'une usine pharmaceutique française à une concentration d'environ 10 mg/L (Benotti et Snyder, 2009). Malgré son utilité dans la médecine humaine et vétérinaire, une attention particulière a été consacrée à cette molécule en raison de ses caractéristiques qui font d'elle un perturbateur endocrinien. Sa présence en dessus d'un certain seuil peut entraîner des effets néfastes sur la reproduction, la croissance et le développement des organismes (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

La contamination de l'eau avec la DXN peut affecter le système nerveux des animaux aquatiques ainsi que les espèces qui les consomment. Ceci peut provoquer des changements dans les types et les quantités des bactéries de la flore microbienne intestinale. De même, elle peut inhiber la colonisation des probiotiques dans les flores intestinales ce qui peut augmenter le risque d'invasion par les bactéries intestinales pathogènes (Yang *et al.*, 2016).

Des études précédentes ont montré que la DXN peut affecter négativement la fertilité. Elle peut provoquer des états pathologiques du cortex surrénalien tels que le syndrome de Cushing associé à un dysfonctionnement ovarien, y compris l'anovulation chronique et le syndrome ovarien polykystique (Armstrong, 1986). Ses effets sur la fonction ovarienne peuvent se produire à l'hypothalamus en diminuant la synthèse et la libération de la GnRH, à l'anté-hypophyse afin d'inhiber la libération stimulée par la GnRH de l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) ou l'ovaire pour moduler la stéroïdogénèse et/ou l'ovogénèse (Fonda *et al.*, 1984; Rosen *et al.*, 1988; Li, 1993).

Dans le milieu aquatique, la dexaméthasone (DXN) peut affecter négativement le développement embryonnaire des larves de certaines espèces de vertébrés aquatiques, ce qui conduit à des déformations de la progéniture. Ces déformations sont reconnues par l'immobilité des larves, des modèles de natation aberrants, une taille inhabituelle, des courbures anormales de la colonne vertébrale, des malformations du sac vitellin, l'œdème, ou tout raccourcissement du corps (LaLone *et al.*, 2012). De même, les femelles de Vairons à grosse tête exposées à 50  $\mu\text{g/L}$  de dexaméthasone (DXN) ont montré une augmentation significative de la masse de l'ovaire par rapport à la masse corporelle, ce qui correspond à une légère augmentation du nombre d'œufs (LaLone *et al.*, 2012).

### 1.5 Les méthodes de détection des contaminants hormonaux dans l'eau

La présence de la DXN pendant une longue durée dans les milieux aquatiques peut entraîner la mortalité et l'extinction de certaines espèces, ce qui nécessite une surveillance précoce et un suivi. Par conséquent, la surveillance précise de la concentration des contaminants dans les échantillons environnementaux et cliniques est très importante. De ce fait, l'élaboration d'une méthode de détection

rapide et sensible pour la détermination de la DXN est d'une grande importance dans la recherche médicale et environnementale.

Plusieurs méthodes sont actuellement utilisées pour la détection des hormones et des produits pharmaceutiques dans l'environnement et en particulier dans l'eau. Les méthodes d'analyse instrumentales telles que la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) ou encore la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) sont très sensibles (Tölgyesi *et al.*, 2010; Beiraghi *et al.*, 2014; Reig *et al.*, 2006). Cependant, ces méthodes sont généralement coûteuses, prennent beaucoup de temps d'analyse et exigent un personnel hautement qualifié pour les effectuer, ce qui les rend inadaptées pour les applications sur le terrain.

De même, il existe des méthodes immunologiques telles que l'*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) et radio-immunologique (RIA) ou encore le dosage CALUX. Cependant, le RIA nécessite un équipement spécialisé et coûteux pour gérer et traiter les matériaux radioactifs et dangereux ce qui apporte des préoccupations de protection de l'environnement. De même, les kits ELISA sont généralement coûteux, prennent beaucoup de temps et nécessitent plusieurs étapes de préparation (Capparelli *et al.*, 1987; Hassan *et al.*, 1997; Shrivastav *et al.*, 2010). Le dosage CALUX est aussi sensible, mais il requière des gènes et des cellules animales ce qui peut engendrer des mutations génétiques. Il nécessite aussi des méthodes de référence comme GC/MS pour la confirmation et le contrôle de qualité.

Pour pallier aux limites des méthodes existantes, plusieurs recherches ont été consacrées pour le développement de nouvelles techniques de détection simples et plus sensibles. Les biosenseurs ont récemment suscité un intérêt considérable pour une variété d'applications biomédicales et environnementales et sont apparus comme une alternative intéressante aux procédés analytiques classiques. Récemment, des immunocapteurs ont été proposés comme une bonne alternative aux méthodes analytiques et immunologiques traditionnelles. À titre d'exemple, un immunocapteur photoélectrochimique basé sur la stratégie concurrentielle a été proposé pour la détection de la DXN (Wang *et al.*, 2015). Le principe se base sur l'utilisation du nitrure de carbone graphitique couplé avec du sulfure de bismuth en tant que matrice de détection pour l'immobilisation de la DXN sur la surface de l'électrode. Tandis que le dioxyde de sulfure de cadmium de titane fonctionnalisé est utilisé comme marqueurs actifs photoélectrique anti-(DXN). En dépit de leur facilité d'utilisation, les immunocapteurs souffrent d'une limitation majeure, à savoir l'utilisation d'anticorps comme récepteur de biorecognition. La production d'anticorps est très coûteuse et nécessite l'utilisation d'animaux de laboratoire, ce qui soulève des préoccupations éthiques (Perry, 1998). Par ailleurs, des anticorps ciblant des molécules similaires souffrent habituellement de réactivités croisées et nécessitent ainsi des conditions de stockage et de manutention spéciales.

## 1.6 Organisation et contribution du mémoire

À la lumière de ces préoccupations, et afin de pallier les limitations des techniques mentionnées précédemment, nous proposons dans le cadre de ce mémoire une nouvelle approche pour la détection de la DXN dans l'eau. L'approche proposée consiste à développer une nouvelle plateforme de biocapteurs à base d'aptamères très sensible et hautement sélective à la DXN et plus performante comparativement à l'offre commerciale actuelle en termes de sensibilité, de coût et de simplicité d'utilisation.

Nos contributions de ce travail peuvent être résumées comme suit :

1. Nous développons une nouvelle plateforme de biocapteurs à base d'aptamère pour la détection de la DXN dans l'eau. La plateforme développée offre une sensibilité et sélectivité élevées pour cette hormone. Au meilleur de nos connaissances, aucun aptacapteur électrochimique n'a été développé au paravent pour la détection de la DXN. La technique proposée implique la sélection d'un seul aptamère qui dispose de la meilleure affinité et spécificité à la DXN à partir d'une grande bibliothèque aléatoire.
2. Les aptamères ont plusieurs avantages par rapports aux autres éléments biorécepteurs dont la sélection *in vitro* même pour des petites molécules, la facilité de synthèse et de modification à faible coût ainsi que la stabilité à différentes conditions de stockage. Les biocapteurs à base d'aptamères sont des dispositifs portatifs, rapides et les mesures se font directement sur le terrain sans prélèvement ni échantillonnage et ne nécessitent pas l'utilisation d'équipements avec personnels qualifiés. Cette simplicité d'utilisation permet de distinguer l'approche proposée des autres méthodes existantes.

Le reste de ce document est organisé comme suit :

Le deuxième chapitre présente une généralité sur les biocapteurs, leur historique, les différentes classes de biocapteurs existants ainsi que leurs différentes applications. En particulier, nous mettons l'accent sur chaque classe de biocapteurs en discutant ses avantages et inconvénients ainsi que leurs applications pratiques.

Le troisième chapitre décrit la méthodologie proposée en détails. Spécifiquement, dans ce chapitre, nous présentons la méthode d'évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (SELEX) utilisée pour isoler les bons aptamères à partir d'une grande bibliothèque aléatoire. Par la suite, nous décrivons

les techniques de caractérisation qui permettent de déterminer l'affinité et la spécificité des aptamères sélectionnés ainsi que le changement de leur conformation lors du contact avec l'analyte DXN. Finalement, la dernière partie de ce chapitre sera consacrée à la détermination de la limite de détection (LOD) de l'aptacapteur développé et son application sur des échantillons réels.

Le quatrième chapitre présente une évaluation détaillée de notre méthodologie. Précisément, dans ce chapitre, nous menons des expérimentations sur différentes étapes où nous discutons et interprétons les résultats obtenus et la performance de l'approche utilisée. Finalement, le cinquième chapitre conclut ce mémoire.

## CHAPITRE II

### GÉNÉRALITÉS SUR LES BIOCAPTEURS

#### 2.1 Définition d'un biocapteur

Un biocapteur est généralement défini comme un dispositif récepteur-transducteur conçu pour transformer un événement de reconnaissance biologique en un signal mesurable (Lowe, 1984). Ce dernier est corrélé avec la concentration du composé détecté. Généralement, le biocapteur peut se décomposer en plusieurs constituants dont :

1. Le biorécepteur : c'est l'élément de reconnaissance où un événement biologique aura lieu suite au contact avec l'analyte donnant ainsi un signal mesurable. Il peut représenter un anticorps, une enzyme, des acides nucléiques, des tissus cellulaires ou encore des bactéries.
2. Un transducteur : couplé au biorécepteur, ce constituant est choisi d'une façon à ce que l'interaction du biorécepteur et l'analyte étudié entraîne des effets mesurables, et ce selon diverses formes (électriques, mécaniques, thermiques, chimiques, magnétiques, optiques ou radiatifs).
3. Un système électronique de mesure et de traitement de l'information associé à la plateforme de transduction pour lire et convertir le signal. Ce dernier comprend un amplificateur de signal, un processeur et un afficheur.

La figure 2.1 illustre un schéma représentatif des composants d'un biocapteur.

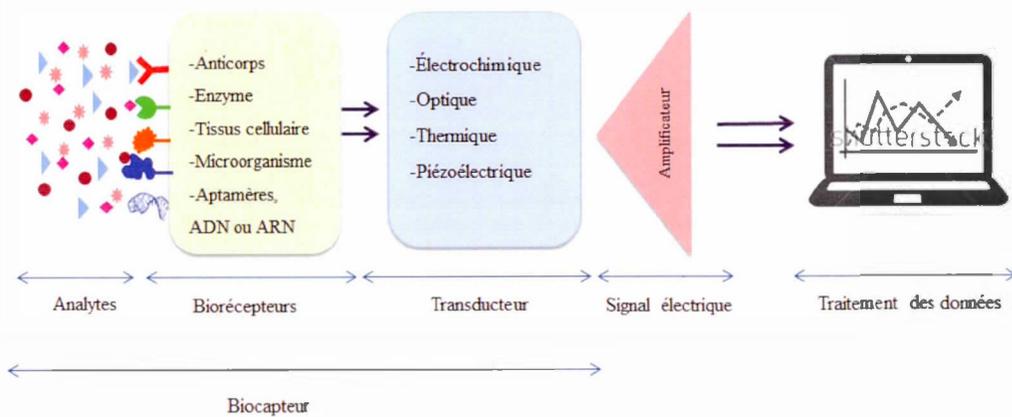


Figure 2.1: Structure schématique et principe de fonctionnement d'un biocapteur.

Les biocapteurs constituent des éléments d'analyse particulièrement avantageux en raison de leurs caractéristiques intéressantes qui les distinguent des autres instruments analytiques classiques. Celles-ci incluent :

- La sélectivité ou leur aptitude à détecter l'espèce cible d'une façon spécifique.
- La sensibilité qui correspond à un seuil de détection bas qui permet d'avoir un signal de sortie même pour un faible signal d'entrée.
- La résolution qui correspond à la capacité de détecter de très petite variation du signal mesurable. Cette propriété dépend de la sensibilité du biocapteur et de sa tolérance au bruit de mesure (Bruit de fond).
- La stabilité c'est-à-dire la capacité du capteur à maintenir ses performances sans changement significatif tout au long de la mesure. On trouve une stabilité à court terme qui joue un rôle prépondérant sur la résolution du capteur. Elle est généralement inhérente au bruit de mesure intrinsèque au système ou liée à des perturbations extérieures telles que l'injection des

fluides. La stabilité à moyen ou à long terme correspond à la dérive liée au vieillissement du dispositif.

- La rapidité ou la capacité à générer une réponse fiable et exacte en un temps réduit compatible avec l'application.
- La biocompatibilité qui signifie la capacité à conserver (ou à altérer au degré le moins possible) les systèmes vivants au contact du biocapteur.
- La robustesse et simplicité d'utilisation dont la non nécessité du personnel qualifié ou le prélèvement des échantillons et leur transport.

En vue d'une commercialisation, ces paramètres sont importants à considérer dès les premières étapes de conception du biocapteur.

## 2.2 Historique

Historiquement, le premier biocapteur a été découvert par Clark en 1950 dans le but de mesurer la concentration en oxygène dissout dans le sang (Clark Jr, 1956). En 1962, ce biocapteur a été utilisé pour mesurer aussi la concentration du glucose dans le sang. En 1967, Updike et Hicks (1967) ont élaboré les premières électrodes enzymatiques. Cependant ce biocapteur n'a été commercialisé aux États Unis qu'en 1973 dans le but de doser le taux de la glycémie en utilisant une détection ampérométrique de peroxyde d'hydrogène.

Au cours des dernières décennies, la technologie des biocapteurs a évolué dans des domaines très variés tels que la médecine, la biologie, l'agroalimentaire, l'agriculture, l'industrie et aussi le contrôle de l'environnement. Le champ d'application des biocapteurs n'a cessé de s'étendre au cours des dernières années, tout en introduisant des dispositifs simples et miniaturisés, parfaitement adaptés aux avancées technologiques modernes. Cette réussite est due au caractère multidisciplinaire

de la discipline de conception des biocapteurs, qui se situe entre la biologie, la chimie, la physique et la microélectronique. Le tableau 2.1 présente les différentes applications des biocapteurs.

Tableau 2.1: Domaines d'application des biocapteurs.

Domaines	Applications
Environnement	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Détection des contaminants et des substances toxiques.</li> <li>• Suivi des concentrations des résidus médicamenteux.</li> <li>• Analyse des eaux et des sols.</li> </ul>
Agroalimentaire/ Contrôle de qualité	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suivi de la chaîne du froid.</li> <li>• Maturité des fruits (mesure du taux des éléments nutritifs).</li> <li>• Détection des agents pathogènes (Par ex E. coli).</li> <li>• Dosage du glucose dans les viandes et les produits laitiers.</li> <li>• Recherche des agents pathogènes dans la viande fraîche, la volaille ou les poissons et même les charcuteries.</li> </ul>
Agriculture	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Surveillance des maladies et des traitements phytosanitaires.</li> </ul>
Santé	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analyse clinique et diagnostique des marqueurs biologiques (Biocapteur pour l'analyse de la glycémie chez les patients atteints de diabète par exemple).</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Identification des maladies infectieuses.</li> <li>• Suivi en temps réel la concentration des molécules dans le sang et dans l'organisme.</li> <li>• Étude de plusieurs paramètres physiologiques.</li> </ul>
Industrie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suivi de la toxicité des résidus industriels.</li> <li>• Mesure des hydrates de carbone, alcools et acides, pendant les procédés de contrôle de qualité.</li> </ul>

Les progrès réalisés dans le domaine des biocapteurs depuis le début du 21ème siècle ont été possibles grâce à l'évolution des micro et des nanotechnologies, des sciences des matériaux, de la biotechnologie, de la microélectronique et de l'informatique. Les chercheurs sont maintenant capables de manipuler et d'isoler des structures, telles que l'ADN comme des biorécepteurs, de les associer avec des nanotubes de carbones ou des nanoparticules d'or ou d'argent. Les transducteurs sont par ailleurs de natures très variées et de tailles de plus en plus petites. En général, les plateformes de détection sont donc basées sur plusieurs principes tant sur le phénomène de biorecognition moléculaire, que sur le mode de la transduction qu'il peut être optique, électrique, chimique, électrochimique, électromagnétique, mécanique, thermiques ou encore piézoélectriques. De plus, il est aussi faisable de combiner plusieurs composants pour mettre au point de véritables laboratoires miniaturisés tel qu'il est le cas avec les laboratoires sur puce ou LOC (*Lab On a Chip*) (Ferro *et al.*, 2012).

Les performances et la simplicité de fonctionnement des biocapteurs ont été fortement améliorées au fil du temps et les techniques de traitement du signal deviennent plus rapides et précises. De même, la possibilité de combiner une large gamme d'entités biologiques et de transducteurs permet une résolution plus efficace de différents problèmes analytiques dans le domaine de la santé, de l'agroalimentaire ou encore de l'environnement. Ainsi, on peut dire que les biocapteurs visent à développer et à optimiser des microsystèmes portatifs, autonomes et faciles qu'on appelle aussi les microsystèmes d'analyse totale ( $\mu$ TAS).

### 2.3 Classification des biocapteurs

Généralement, les biocapteurs peuvent être classés selon le type d'élément de biorecognition et aussi la nature de transducteur. Ils peuvent également être

nommés selon la façon dont la biodétection prend lieu. Si le biorécepteur grippe à l'analyte, le biocapteur est nommé un biocapteur d'affinité. De même, si le biorécepteur et l'analyte provoquent un changement chimique pouvant être utilisé pour mesurer la concentration d'un substrat, le biocapteur est appelé métabolique. Finalement, on parle de biocapteur catalytique lorsque le biorécepteur se combine avec l'analyte pour le convertir en un substrat auxiliaire sans pour autant entraîner aucun changement chimique.

### 2.3.1 Classification selon le type du biorécepteur (Ligand)

Comme précédemment discuté, le biorécepteur représente un élément très important des plateformes de détection. Son rôle principal consiste à garantir la liaison entre l'analyte et l'élément de transduction. En outre, un transducteur ne peut pas interférer d'une manière directe et efficace avec le milieu de détection. Ainsi, il lui faut une fonctionnalité qui lui permet d'avoir des propriétés de reconnaissances indirectes. Le rôle principal du biorécepteur est ainsi la fonctionnalisation physique ou chimique du transducteur. L'affinité du biorécepteur aux analytes étudiés, ainsi que le rôle d'amplificateur qu'il joue (en raison de sa contribution à la sensibilité globale de la plateforme de détection) font de lui un élément important de la plateforme de biodétection. Généralement, il existe un grand choix de substances qui peuvent être utilisées comme des éléments de bioreconnaissance dans un biocapteur. Ces bioéléments vont interférer avec les analytes selon certains principes biochimiques et ainsi peuvent être utilisés comme un critère de classification. Parmi les principales catégories de biorécepteurs on cite :

#### 2.3.1.1 Les anticorps

Les Anticorps sont des protéines produites par des lymphocytes B et plus précisément les plasmocytes en réponse aux excitations antigéniques tels que les

envahisseurs étrangers ou les microbes et les virus. Ce sont des glycoprotéines appartenant à la grande famille des immunoglobulines et sont aussi composés de plusieurs chaînes moléculaires (Binder, 1990). Les anticorps sont souvent utilisés comme des biorécepteurs dans des dosages immunologiques et aussi en biologie et en particulier dans les tests ELISA. Les anticorps sont généralement immobilisés sur la surface des transducteurs par des liaisons covalentes suite à des conjugaisons des groupements d'amines, de carboxyles, d'aldéhydes et/ou des sulfhydriques. En outre, les anticorps nécessitent des conditions bien spécifiques, car ils sont sensibles aux changements de pH, de la concentration ionique, des inhibiteurs chimiques et de la température. Ils utilisent des transducteurs d'ordre optique, par fluorescence ou les transducteurs acoustiques et même électrochimiques (Luppa *et al.*, 2001).

#### 2.3.1.2 Les micro-organismes et les cellules biologiques

Les biorécepteurs à base de micro-organismes, de tissus biologiques ou même des cellules spéciales comme la pulpe de fruits, les membranes cellulaires, les bactéries, les champignons ou les microalgues utilisent dans la plupart du temps des réactions enzymatiques plus stables et équilibrées avec les analytes. Dernièrement, ces bioéléments à base des cellules complètes ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs, à cause de leur spécificité comme le montre les travaux menés par Gammoudi *et al.* (2010) sur la biodétection d'*E. coli* et le groupe de Lopez sur les virus (Lopez *et al.*, 2011).

Les microbes peuvent être aussi employés en tant que biorécepteurs afin de mesurer plusieurs paramètres tels que la consommation de l'oxygène ( $O_2$ ) (Chang *et al.*, 2004) ou du dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) (Chiappini *et al.*, 2010) dans l'environnement ou même dans l'eau. Les biocapteurs à base de microbes ont plusieurs avantages car ils sont plus stables. Cependant leur inconvénient majeur est leur

sélectivité très faible comparativement aux autres biorécepteurs.

#### 2.3.1.3 Les enzymes

Les enzymes sont des protéines de catalyse biologiques. Elles se classent en plusieurs familles selon le rôle qu'elles jouent. À titre d'exemple, on cite l'hydrolyse par décomposition de certaines molécules et la catalyse des restructurations intramoléculaires (isomérases) ... etc. Elles sont utilisées dans les biocapteurs à cause de leur sélectivité élevée pour un substrat bien défini auquel elles se fixent tout en produisant une modification catalytique. En effet, elles offrent de nombreux avantages et spécifiquement la reproductibilité des groupements (Delvaux et Demoustier-Champagne, 2003). Cependant, leur fonctionnement est généralement non stable ce qui nécessite l'intervention des cofacteurs ou plusieurs enzymes associées pour le même biocapteur.

#### 2.3.1.4 Les aptamères

Les aptamères sont de simples brins d'ADN (ADNsb) ou d'ARN de petite taille (oligonucléotides d'environ 100 nucléotides) sélectionnés *in vitro* à partir d'une bibliothèque de séquences aléatoires synthétiques. Ils se replient en une structure 3D unique en raison des interactions intramoléculaires entre les nucléotides. Ces structures uniques leur permettent de se lier avec une forte affinité à un analyte spécifique par des interactions intermoléculaires telles que des liaisons d'hydrogène et les forces de Van der Waals (Stoltenburg *et al.*, 2005, 2007).

Dernièrement, les aptamères ont émergé comme une bonne alternative aux autres biorécepteurs et précisément aux anticorps. Ceci est principalement à cause de leurs avantages dont (Perry, 1998) :

1. La sélection *in vitro* sans utilisation des animaux de laboratoire.

2. La possibilité d'être développés contre des composés de faible poids moléculaire qui est difficilement réalisable avec des anticorps.
3. La sélectivité à différentes parties de la molécule cible ou l'analyte étudié.
4. La synthèse des séquences d'aptamère déjà identifiées avec une pureté et une reproductibilité élevée à un très faible coût, contrairement aux anticorps qui nécessitent l'utilisation des animaux de laboratoire et souffrent d'une reproductibilité limitée.
5. La modification chimique facile à travers divers marqueurs et groupes fonctionnels afin d'être immobilisés sur différents supports solides et/ou des électrodes.
6. La stabilité élevée à différentes conditions.

Les premiers aptamères ont été développés dans les années 90 (Tuerk *et al.*, 1990; Ellington et Szostak, 1990). Depuis, de nombreux aptamères ont été sélectionnés au cours des deux dernières décennies contre divers analytes. Ceci inclut des ions métalliques, des petites molécules dont les toxines, des bactéries, des virus, des protéines et des cellules (Eissa *et al.*, 2013; Stoltenburg *et al.*, 2007; Jo *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2011; Radi et O'Sullivan, 2006). Dans le cas des molécules à faible poids moléculaire comme les narcotiques et les hormones stéroïdiennes, la liaison est liée au changement conformationnel de l'aptamère (Citartan *et al.*, 2012). Les signaux sont traduits par la suite grâce à différents mécanismes, dont la colorimétrie (Barthelmebs *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011), la fluorescence (Sassolas *et al.*, 2011; Yildirim *et al.*, 2012) et l'électrochimie (Lin *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2013; Zayats *et al.*, 2006). À ce jour, il existe seulement quelques aptamères développés pour détecter les hormones, comme la thyroxine (Kawazoe *et al.*, 1998), la vasopressine (Williams *et al.*, 1997), la progestérone (Contreras Jiménez *et al.*, 2015) et l'estradiol (Zhu *et al.*, 2015).

Les avantages que possèdent les aptamères ont ouvert la voie à la fabrication d'une nouvelle génération de biocapteurs à faible coût avec une plus grande stabilité et de simples stratégies de détection. Ces biocapteurs ont été conçus en utilisant différentes stratégies et en particulier le changement conformationnel de l'aptamère lors de la liaison avec l'analyte.

### 2.3.2 Classification selon la plateforme de détection

La spécificité du biocapteur est portée par le biorécepteur, alors que la sensibilité par le transducteur. Le rôle du transducteur est d'assurer la conversion en signal électrique le signal obtenu par le couplage entre le biorécepteur et les espèces à détecter, de manière directe ou indirecte (à travers un médiateur chimique). En raison de la richesse de la littérature, nous nous limitons dans cette partie aux principaux types de transducteurs et plateformes existantes qui se rattachent à notre application dans ce projet de recherche. En particulier, nous nous limitons aux études pertinentes les plus récentes, notamment par rapport aux techniques commercialisées.

#### 2.3.2.1 Les plateformes piézoélectriques

Ces biocapteurs se basent sur la mesure des oscillations d'un matériau sur lequel est immobilisé le biorécepteur. Généralement, le quartz cristallin est le matériau le plus utilisé, car il possède la propriété de pouvoir osciller sous l'influence d'un stimulus électrique lorsqu'on l'émerge soit partiellement ou complètement dans une solution. Cette caractéristique permet de contrôler les variations de la masse à la surface du cristal. Cette catégorie de biocapteurs offre des réponses rapides. Cependant, leur sélectivité dépend toujours de la couche active et peut ainsi être insensible relativement au système oscillant utilisé. La figure 2.2 illustre un schéma récapitulatif du biocapteur de cristal de quartz (Liss *et al.*, 2002).

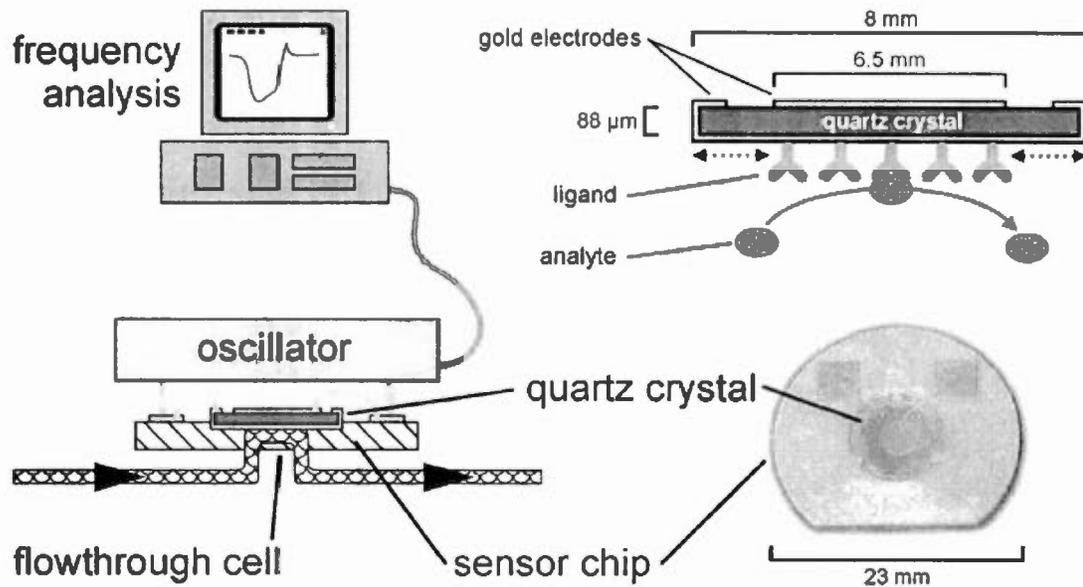


Figure 2.2: Schéma descriptif du fonctionnement d'un biocapteur piézoélectrique de cristal de quarts Liss *et al.* (2002).

Liss *et al.* (2002) ont développé un biocapteur de cristal de quarts afin de déterminer les concentrations et les paramètres d'affinité des ligands en temps réel. Ils ont utilisé un système basé sur le modèle Immunoglobuline E (IgE) humaine et des aptamères comme ligands.

### 2.3.2.2 Les plateformes manométriques

Les biocapteurs manométriques se basent sur la mesure des modifications de pression d'un gaz. Réellement, un changement de la concentration d'un gaz dans un orifice provoque d'une manière indirecte un changement de la pression partielle du gaz. En général, cette catégorie de biocapteurs utilise les enzymes comme biorécepteurs. Ces dernières permettent de transformer la molécule cible en gaz. Ces biocapteurs sont avantageux, car ils ne rentrent jamais en contact direct avec l'échantillon à analyser (Jenkins et Delwiche, 2003).

### 2.3.2.3 Les plateformes thermiques

Les biocapteurs thermiques ou enthalpimétriques sont apparus dans les années 1970 (Weaver *et al.*, 1976). Ils sont destinés à transformer le signal biochimique obtenu par la liaison de l'analyte au ligand en un signal thermique. Cette technique permet de quantifier la concentration d'une molécule par le changement d'enthalpie associé à la réaction biochimique, en se basant sur les réactions exo ou endothermiques. Généralement, les variations de la température  $\Delta T$  sont mesurées par un microcalorimètre ou une résistance thermique et sont associées aux modifications d'enthalpie  $\Delta H$  et la capacité de chaleur du réacteur. Ils sont destinés pour les domaines pharmaceutiques et cliniques, tel qu'il est le cas avec la détection de la pénicilline et du glucose (Danielsson et Flygare, 1990; Ramanathan *et al.*, 2001). Ils utilisent des biorécepteurs à base d'anticorps TELISA (*Thermometric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) dont le plus connu a été dédié à la mesure de l'insuline (Ramanathan et Danielsson, 2001). Ils ont l'avantage de générer des réponses rapides de 1 à 3 min. Ils sont aussi reproductifs et se caractérisent par la stabilité des colonnes. Cependant ils sont coûteux et nécessitent un prétraitement de certains échantillons.

### 2.3.2.4 Les plateformes optiques

Les biocapteurs optiques sont largement utilisés dans plusieurs domaines en vue de leur sélectivité et sensibilité. Plusieurs principes et procédés de détection sont utilisés dans l'élaboration de ces biocapteurs dont les plus courants sont l'absorbance, la fluorescence et la résonance plasmonique de surface (SPR) ou des ondes évanescentes.

- *Biocapteurs mesurant l'absorbance* :

Dans cette série de biocapteurs, la liaison entre le biorécepteur et l'analyte se traduit par l'apparition d'une couleur dans le milieu réactionnel. À titre illustratif, la formation du complexe immun suite à l'interaction entre un antigène et un anticorps, va être révélée par l'addition d'un anticorps secondaire marqué par une enzyme comme la peroxydase de raifort ou la phosphatase alcaline. En effet, l'ajout de ces enzymes provoque l'apparition d'une coloration détectée à une longueur d'onde bien déterminée avec modification de l'absorbance (Abdullah *et al.*, 2007).

- *Biocapteurs mesurant la fluorescence* :

Le principe de ce groupe est le même que celui des biocapteurs mesurant l'absorbance, sauf que l'interaction entre le biorécepteur et l'analyte se traduit par une émission de fluorescence. Dans ce cas, la révélation du complexe anticorps-antigène est liée à un anticorps secondaire marqué avec une sonde fluorescente. Notant aussi que la spécificité de ces biocapteurs est accrue en utilisant des microorganismes génétiquement modifiés.

En effet, dans une cellule, un promoteur de gène spécifique à un réactif connu ou à un certain analyte est introduit. Ce promoteur est combiné à un gène codant permettant l'expression d'une protéine qui peut être détectée facilement. Parmi les gènes les plus connus, on trouve le GFP responsable de la production de la Green Fluorescent Protéine (GFP) qui est une protéine naturellement fluorescente (Matz *et al.*, 1999).

La détection par fluorescence a aussi utilisé les aptamères comme éléments de biorecognition. Elle est largement utilisée en raison de la simplicité de l'étiquetage des aptamères par les molécules fluorescentes et la disponibilité de différents types de fluorophores. La figure 2.3 montre trois cas d'utilisation des aptamères en combinaison avec des molécules fluorescentes.

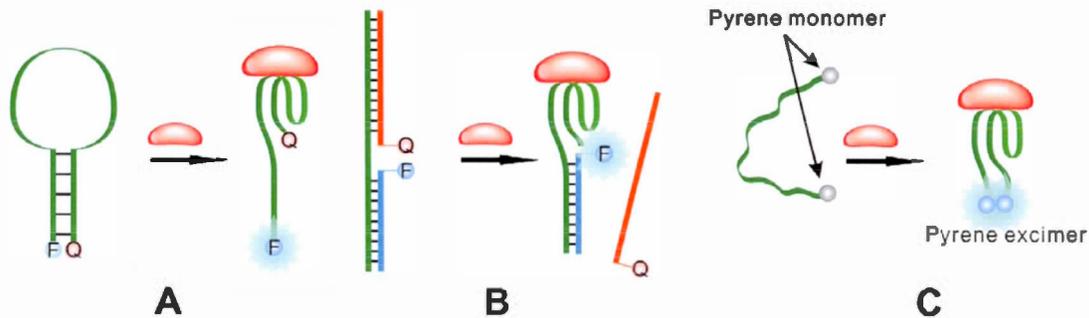


Figure 2.3: Combinaison d'aptamères avec des molécules fluorophores et des molécules inhibitrices (Song *et al.*, 2008).

La figure 2.3 (A) représente une séquence d'aptamère sous forme d'une balise moléculaire. Cette séquence est marquée à l'extrémité avec un fluorophore (F) et un désactivateur (Q) dont l'interaction avec l'analyte a changé la conformation de la tige tout en séparant le (F) de (Q), ce qui a conduit à l'apparition des signaux fluorescents.

La figure 2.3 (B) montre un aptamère marqué par un fluorophore doublé avec une séquence d'ADN complémentaire marqué par un désactivateur. Ce désactivateur a été séparé après le contact de l'analyte avec l'aptamère, provoquant ainsi une augmentation de la fluorescence. Dans le cas de la figure 2.3 (C), on voit un aptamère marqué avec une molécule pyrène à chaque extrémité, cette molécule produit des signaux stables et fluorescents suite à la formation du complexe aptamère-analyte (Song *et al.*, 2008).

- *Biocapteurs à base d'ondes évanescentes et à résonance plasmonique de surface (SPR) :*

Le phénomène d'évanescence se produit lorsqu'un faisceau de lumière polarisée illumine une interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents. Cette lumière produit un rayon réfléchi sur l'interface et un autre réfracté à travers l'interface. Néanmoins, la lumière peut être complètement réfléchie dépendamment de l'angle d'incidence, ce qui produit une onde électromagnétique appelée onde évanescente. Cette dernière se diffuse perpendiculairement à la surface de l'interface. L'onde évanescente induit un changement de l'indice de réfraction du milieu par son énergie ce qui entraîne une modification de l'angle de résonance. Cette variation peut être mesurée par le capteur, donnant place à un phénomène appelé <miroir résonant> (Hutchinson, 1995).

Les biocapteurs basés sur le principe des ondes évanescentes ont l'avantage de mesurer les interactions entre des biomolécules non étiquetées en temps réel. L'interaction entre les biorécepteurs et l'analyte est mesurée en enregistrant les changements de l'indice de réfraction provoqués par les molécules qui interagissent à proximité de la surface du capteur (Hutchinson, 1995).

Les biocapteurs à résonance plasmonique de surface (SPR) sont très commercialisés depuis la découverte de la technique SPR par Wood (1902). Ce phénomène est fondé sur le principe d'onde évanescente et les lois de la mécanique quantique. Ils peuvent se réaliser selon deux méthodes. La première consiste à la mesure des changements de l'angle de résonance qui varie proportionnellement à la concentration d'analyte immobilisé. Alors que la deuxième s'effectue par la mesure de la modulation de la longueur d'onde de l'angle réfléchi suite à une excitation de la

surface plasmonique par un faisceau parallèle polychromatique. Le contact entre l'analyte et le biorécepteur cause un changement de l'indice de réfraction qui va provoquer à son tour un changement de la longueur d'onde qui est proportionnelle à la quantité d'analytes immobilisés.

La technologie Biacore est considérée parmi les principales applications de la méthode SPR. Elle est très répandue dans le domaine de la biodétection et elle permet de mesurer l'interaction entre les biomolécules non marquées dans une solution à temps réel d'une façon rapide et très sensible. Le biacore est utilisé pour le suivi de cinétiques d'interactions (associations-dissociations) entre les biomolécules. Son principe est illustré dans la figure 2.4 (Gopinath, 2010).

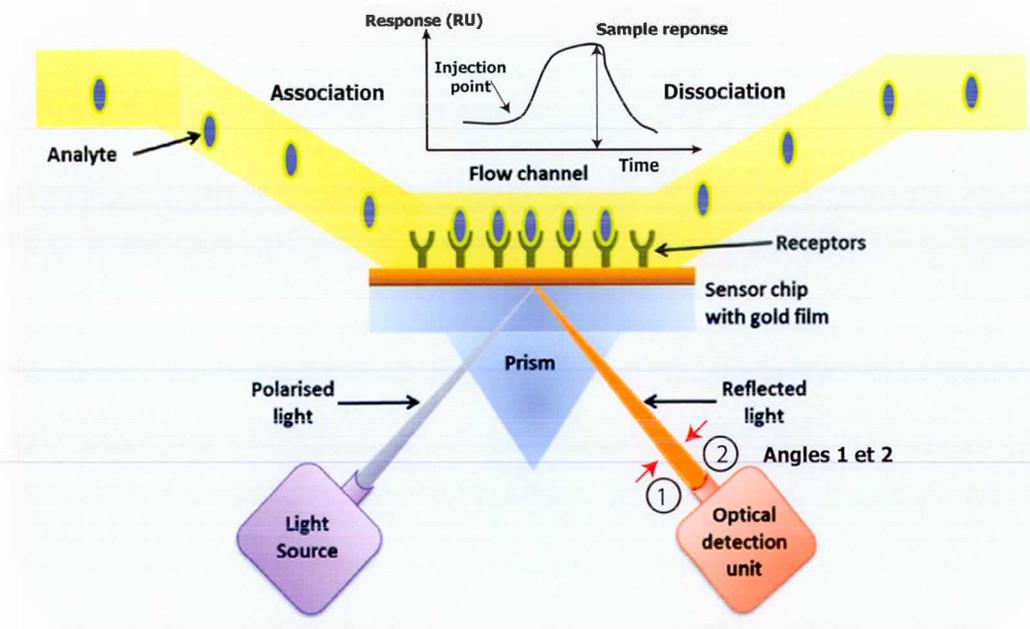


Figure 2.4: Principe du Biacore basé sur la variation d'angle du pic d'absorption (a) proportionnel à l'indice de réfraction du milieu, (b) proportionnel à la concentration des analytes liés aux biorecepteurs (Gopinath, 2010).

Dans le travail de Tombelli *et al.* (2005), un aptamère spécifique à la protéine TAT du VIH-1 a été immobilisé sur des puces SPR en utilisant le pont avidine-biotine. La spécificité de cette réaction a été testée en utilisant la protéine de contrôle de type REV qui est similaire à la TAT.

#### 2.3.2.5 Les plateformes électrochimiques

Ces derniers temps, les biocapteurs électrochimiques ont connu une croissance exponentielle à cause de leurs faibles limites de détection, la large gamme de réponses linéaires, la stabilité élevée, la reproductibilité et leur faible coût. Ces biocapteurs peuvent être appliqués à une grande variété d'échantillons (Grieshaber *et al.*, 2008). Les plateformes électrochimiques sont basées sur la modification des paramètres électriques d'une solution chimique de référence dans laquelle sont réalisées les mesures. Généralement, les mesures électrochimiques sont effectuées à température ambiante en utilisant une configuration à trois électrodes. Une électrode de platine comme une électrode auxiliaire, une électrode Ag/AgCl qui sert comme une électrode de référence et une électrode de travail faite de platine, d'or, de graphène ou de carbone. De nombreux brevets ont été déposés sur ce type de biocapteurs en utilisant différents types de biorécepteurs et les applications sont très variables selon les domaines. Dans ce mémoire, on s'intéresse aux travaux liés à des biocapteurs électrochimiques en utilisant des aptamères.

Les biocapteurs électrochimiques sont classés selon leur mode de transduction. En général, cette dernière peut être ampérométrique (lorsque la réaction génère un courant mesurable), potentiométrique (une accumulation de charge mesurable ou potentiel) et conductimétrique lorsqu'une modification des propriétés conductrices du milieu entre les électrodes se produit. Actuellement, la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) est largement utilisée. Elle permet de contrô-

ler la résistance et la réactance du biocapteur en même temps. Le principe des trois catégories électrochimiques est illustré dans la figure 2.5. Dans ce qui suit, nous présentons une description détaillée sur le mécanisme de chaque catégorie électrochimique en détails.

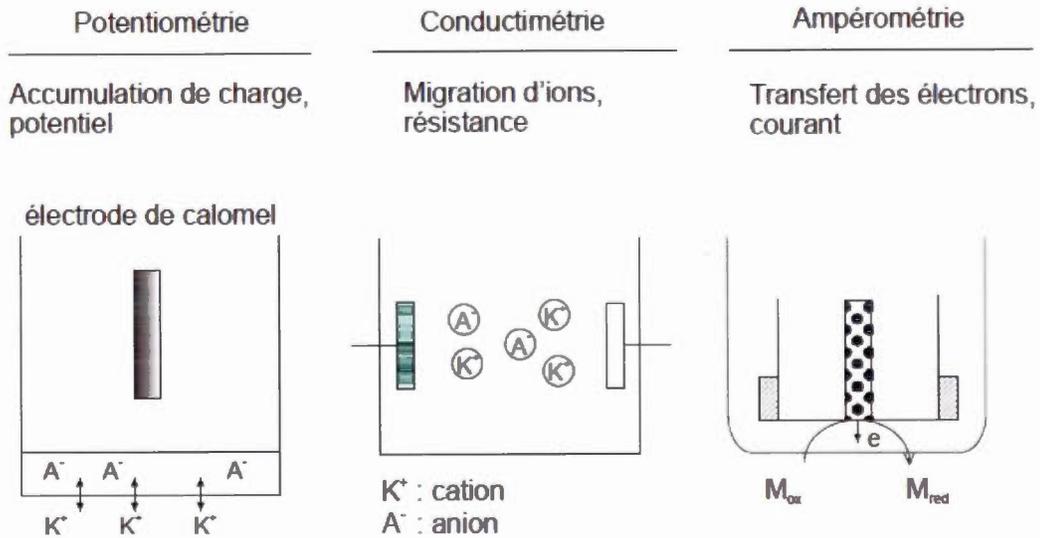


Figure 2.5: Les différents modes de détection électrochimique (Jarrar, 2011)

### - L'ampérométrie et la voltamétrie :

Les biocapteurs ampérométriques et voltamétriques font partie des dispositifs les plus répandus et les plus commercialisés. Ces techniques sont caractérisées par l'application d'un potentiel fixe sur l'électrode de travail et l'électrode de référence afin d'observer et mesurer l'évolution du courant électrique. Le courant électrique traversant le système est alors proportionnel aux concentrations chimiques des constituants de la solution. Le courant ainsi obtenu dépend de plusieurs éléments : l'état de surface, la température des électrodes, le potentiel de travail et la nature de la solution (Kissinger et Heineman, 1996).

La voltamétrie est une technique dans laquelle le potentiel est scanné sur un ensemble d'intervalles de potentiels. La réponse se présente sous forme d'un pic ou d'un plateau qui est proportionnelle à la concentration de l'analyte. Les méthodes voltamétriques sont diverses dont la voltamétrie à balayage linéaire, la voltamétrie cyclique, la voltamétrie hydrodynamique, la voltamétrie à impulsion différentielle (*Differential pulse voltammetry*) ... etc (Kissinger et Heineman, 1996).

Dans l'ampérométrie, les changements dans le courant générés par les réactions d'oxydation ou de réduction électrochimiques sont contrôlés par le temps suite à l'application d'un potentiel fixe sur l'électrode de travail en considérant l'électrode de référence (Bartlett, 2008). L'ampérométrie se distingue par l'absence du potentiel de scanne par rapport à la voltamétrie. Elle est réalisée grâce à un potentiel directement appliqué à la valeur désirée afin de mesurer le courant. Elle peut s'effectuer aussi en gardant le potentiel à une valeur connue tout en examinant les échantillons traversant les électrodes. Le courant dans l'ampérométrie est proportionnel à la concentration des constituants électroactifs dans la solution. Les biocapteurs ampérométriques se caractérisent par leur sélectivité élevée à cause du potentiel d'oxydation ou de réduction utilisé pour la détection des espèces dans les solutions (Eggins, 2008).

La technique ampérométrique est couramment utilisée avec des biocapteurs biocatalytiques ou les biocapteurs d'affinité en raison de sa simplicité et sa faible limite de détection (LOD) (Halsall et Heineman, 1990). Avantagusement, le potentiel fixe utilisé durant la détection ampérométrique entraîne un courant de charge négligeable ce qui minimise le signal de fond qui affecte d'une manière défavorable la limite de détection.

### - *L'impédancemétrie* :

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) a été décrite par Lorenz et Schulze (1975). Elle sert à mesurer la conductance entre deux électrodes immergées dans une solution grâce à l'utilisation d'un courant alternatif afin d'éviter les perturbations de polarisation des électrodes. Le signal ou le courant utilisé est de faible amplitude d'environ 2-10 mV (Suni, 2008). La technique EIS est utilisée principalement pour les biocapteurs d'affinité où les petites variations de l'impédance sont proportionnelles à la concentration de l'analyte (Cooper *et al.*, 2007). Elle est efficace, car elle permet le transfert des électrons à haute fréquence et le transfert de masse à basse fréquence.

La surface des électrodes peut être modifiée par des éléments de bioreconnaissance hautement spécifique à l'analyte. Au cours de l'étape de détection, une tension appliquée sur l'électrode génère un courant qui sera mesuré. La résistance de transfert des électrons à l'interface entre l'électrode et la solution change légèrement une fois l'analyte se lie au biorécepteurs.

Les biocapteurs électrochimiques utilisant l'impédance comme mode de détection ont également connu une grande progression. L'impédance à plusieurs avantages par rapport à l'ampérométrie, plus particulièrement les situations qui impliquent la présence de certains éléments dans les solutions (tel que l'urate et l'ascorbate) qui peuvent contribuer dans le signal ampérométrique si le potentiel de détection n'est pas soigneusement bien choisi. Par ailleurs, ces biocapteurs se caractérisent par leur résistance à la plupart des perturbations de l'environnement, la facilité de détection, le faible coût, la rapidité d'analyse et le temps de réponse court.

L'utilisation des nanomatériaux tels que les nanoparticules d'or et les nanotubes de carbone ou même le graphène dans les biocapteurs impédimétriques est favorable en raison de la grande surface d'électrode, l'amélioration de la conductivité électrique de l'interface de détection, l'accessibilité chimique de l'analyte et l'électrocatalyse.

**- *La potentiométrie :***

Les biocapteurs potentiométriques mesurent la différence de potentiel aux extrémités de deux électrodes selon la loi de *Nernst*. La première électrode est une électrode de référence à potentiel stable tandis que la deuxième est une électrode de travail à potentiel variable (Karyakin *et al.*, 1996). Cette différence de potentiel est proportionnelle à la concentration des analytes présents dans la solution. Ces biocapteurs mesurent en général les variations de pH et de concentrations ioniques. Cette classe de biocapteurs peut être miniaturisée et placée en réseaux (Tsai *et al.*, 2010), ce qui lui permet de s'intégrer dans un LOC incluant différents capteurs. De même, ces biocapteurs possèdent la propriété d'avoir un temps de réponse très court. Leur fabrication s'est développée d'une façon importante dans le milieu industriel ce qui la rend préférable et maîtrisable.

**- *La conductimétrie :***

La conductimétrie est une technique qui permet de surveiller la modification de la conductivité électrique d'un milieu. Son principe est bien la mesure de la conductivité d'une solution électrolytique comprenant des ions électriques mobiles (Jaffrezic-Renault et Dzyadevych, 2008). Le paramètre mesuré est la conductance électrique de biorécepteur fixé sur le transducteur qui varie lorsque le processus de biorecognition mis en œuvre à l'échelle du capteur génère des espèces chargées.

Comparativement aux méthodes précédemment citées, la transduction conductimétrique, a été peu utilisée dans le domaine des biocapteurs. Même si la spécificité de détection de la conductance en solution est très faible, les mesures conductimétriques peuvent être énormément sensibles dépendamment des éléments de biorecognition immobilisés sur la surface des transducteurs.

Depuis quelques années, le développement des biocapteurs conductimétriques a connu un intérêt croissant grâce à plusieurs avantages qu'ils offrent. Parmi ces avantages, on distingue l'absence d'électrode de référence, l'utilisation de tensions alternatives de faible amplitude qui permet d'éviter les processus faradiques d'électrode, l'insensibilité à la lumière et les possibilités de miniaturisation (Tam *et al.*, 2010).

Depuis les années 2000, des chercheurs ont commencé à développer des biocapteurs conductimétrique à base d'acides nucléiques afin de créer de nouvelles techniques aussi simples et rapides. Tam *et al.* (2010) ont par exemple immobilisé de l'ADN sur des électrodes interdigitées pour la détection du virus de l'herpès.

## 2.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons fait un bref survol sur les technologies fondamentales et les aspects multidisciplinaires nécessaires à la mise au point d'une plateforme de détection biologique. Nous pouvons constater que les biocapteurs ont connus une grande évolution depuis leur création au début des années 60. Plusieurs générations de biocapteurs sont découvertes à ce jour, du premier détecteur de glucose aux systèmes évolués tels que les LOC ou les  $\mu$ TAS qui permettent de réaliser les différentes tâches de détection effectuées dans les laboratoires classiques.

En particulier, nous avons passé en revue les domaines d'application des biocapteurs ainsi que les différents types de récepteurs et plateformes de détection. En particulier, nous avons discuté leurs avantages et inconvénients afin d'avoir une idée sur chaque principe et chaque catégorie.

Dans le prochain chapitre, nous allons présenter notre approche afin de développer une plate forme électrochimique à base d'aptamère pour la detection de la dexaméthasone.



## CHAPITRE III

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

Ce chapitre est consacré à la partie expérimentale, qui décrit les techniques et les dispositifs mis au point au développement d'un aptamère spécifique à une substance particulière dans le cadre de nos travaux. Dans un premier temps, nous décrirons en détail la méthode d'évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (SELEX) utilisée pour choisir et trier les aptamères spécifiques à partir d'une grande bibliothèque aléatoire d'ADNs. Ensuite, nous présenterons le protocole du clonage adopté pour la séparation des séquences du même lot, leur identification et leur séquençage. Nous continuerons avec les méthodes de caractérisation des aptamères sélectionnés pour déterminer leur spécificité, leur affinité et leur sélectivité à la DXN afin de choisir la meilleure séquence. Pour terminer ce chapitre, nous décrirons le procédé d'immobilisation de l'aptamère spécifique sur les électrodes d'or (Au) pour effectuer les mesures électrochimiques et déterminer la limite de détection de notre aptacapteur.

#### 3.1 Sélection des aptamères

Pour la sélection des aptamères spécifiques à la DXN, nous avons adopté la méthode SELEX. Dans ce qui suit, nous introduisons cette méthode.

### 3.1.1 Sélection *in vitro* des aptamères par SELEX

SELEX est une méthode très puissante pour déterminer les séquences d'ADN ou d'ARN. Cette technique a été décrite la première fois en 1990 par Ellington et Szostak (1990). Dans l'approche SELEX, on part d'une grande bibliothèque d'oligonucléotides randomisée dont les séquences sont aléatoires. Cela veut dire qu'on y trouve toutes les séquences possibles incluant les séquences reconnues par notre analyte, ainsi qu'une énorme majorité de séquences non reconnues. Elle vise le développement d'aptamères (des oligonucléotides ARN ou ADN simple ou double brin) en se liant à leur cible avec une haute sélectivité en raison de leur forme tridimensionnelle (Abelson, 1996).

Le processus SELEX est effectué sur plusieurs cycles répétés de manière itérative autant que nécessaire, afin d'enrichir les séquences spécifiques de la molécule cible (Stoltenburg *et al.*, 2007). Chaque cycle entraîne une augmentation de l'enrichissement des séquences spécifiques à l'analyte. Il existe de nombreuses stratégies SELEX, mais elles comptent toutes sur la capacité d'isoler les aptamères liés à partir de ceux non liés.

Le processus commence par l'incubation d'une banque composée de  $10^{13}$  -  $10^{15}$  séquences d'ADN simple brin (ADNsb) aléatoires avec la molécule cible qui est immobilisée sur un substrat solide tel qu'il est le cas des billes d'agarose ou de sépharose (Stoltenburg *et al.*, 2007). Chaque cycle de SELEX est composé de cinq étapes consécutives telles qu'illustrées dans la figure 3.1. Ces étapes peuvent être résumées comme suit :

1. L'incubation de la bibliothèque d'ADNs à l'analyte DXN,
2. La séparation des aptamères non liés à partir de l'analyte par lavage,
3. L'éluion de séquences liées à l'analyte,
4. Élimination des sels et l'amplification par réaction en chaîne par polymérase (PCR) des aptamères élués,
5. La dénaturation de l'ADN double brins à partir des produits de PCR par le gel de polyacrylamide 12%.

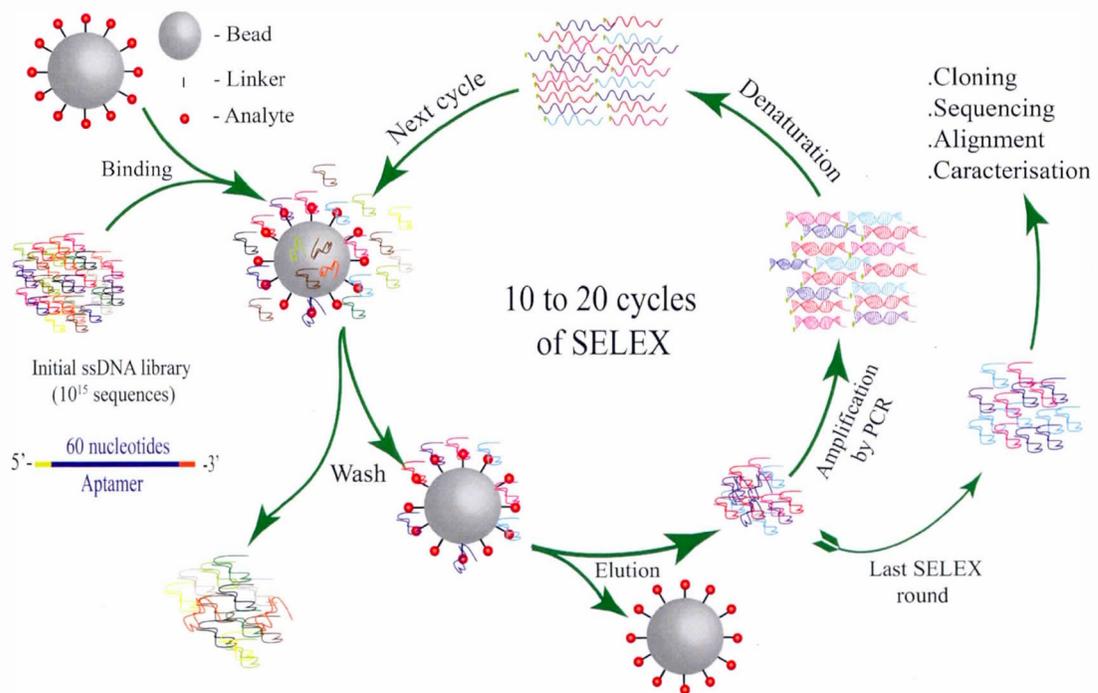


Figure 3.1: Schéma de diagramme général de la technique SELEX.

Dans ce qui suit, nous allons décrire en détail chacune des étapes du processus SELEX adopté pour la sélection des aptamères spécifiques à la DXN.

### 3.1.1.1 Incubation des aptamères avec les perles de DXN sépharose 6 $\beta$

La liaison entre la DXN et les aptamères est effectuée grâce à un tampon de liaison (Binding Buffer ou BB) constitué respectivement de NaCl (150 mM) ; TRIS-HCl (50 mM) dont le pH est de 7,4 et de MgCl<sub>2</sub> (2 mM).

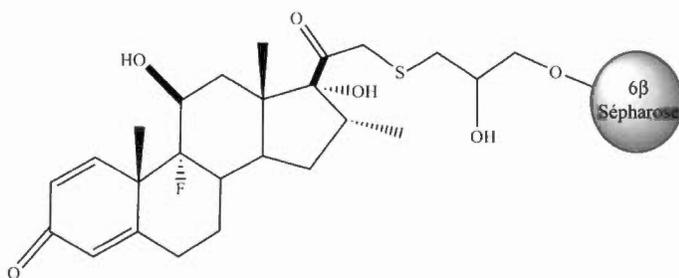


Figure 3.2: Schéma de la structure des perles de DXN sépharose 6 $\beta$ .

Dans le premier cycle, nous avons utilisé une bibliothèque de 1,794 nmol équivalent à  $1,08 \times 10^{15}$  de séquences aléatoires où chaque séquence se compose d'environ 60 nucléotides. Une solution de 250  $\mu$ L de cette banque de séquences a été préparée dans le tampon BB et incubée avec 50  $\mu$ L d'analyte DXN après avoir été lavé à son tour cinq fois avec le tampon BB et centrifugé après chaque lavage (à 1,2 rpm ; 2 min). L'ADNsb a subi un prétraitement avant de l'incuber avec les perles de DXN. Ce dernier consiste à chauffer l'ADNsb à 90°C pendant 5 minutes, ensuite le mettre à 4°C pendant 10 minutes et enfin à une température ambiante pendant 5 minutes. Après avoir transférer la solution d'ADNsb dans les tubes filtres contenant la DXN, on les laisse incuber pendant deux heures sous agitation à température ambiante.

### 3.1.1.2 Lavage

Après les deux heures d'incubation, on rajoute un volume 250  $\mu\text{L}$  de tampon BB pour laver les perles contenant la DXN. L'objectif est d'éliminer les séquences d'ADNsb non liées. Ce lavage est effectué à plusieurs reprises pour se débarrasser des séquences faiblement liées. Après chaque lavage, on mesure la concentration d'ADNsb dans le filtrat obtenu par fluorescence à l'aide d'un *Thermo Scientific NanoDrop 3300 fluorospectrometer* jusqu'à l'obtention d'une valeur avoisinant le zéro.

### 3.1.1.3 Éluion

Après le lavage, l'ADNsb fortement lié à la DXN est élué en utilisant un tampon d'éluion (EB) composé de 7M Urea dans le tampon BB. À chaque éluion, on utilise un volume de 250  $\mu\text{L}$  de tampon EB et on chauffe les tubes pendant 10 minutes à 90°C. Le but est de permettre à l'ADNsb d'avoir une structure linéaire et faciliter ainsi son détachement de l'analyte. On refait l'éluion environ six fois, où on centrifuge et on mesure la concentration jusqu'à ce qu'aucune séquence ne soit détectée par les mesures de fluorescence. L'ensemble des éluions est ensuite utilisé pour calculer le rapport final d'ADNsb pour chaque cycle de SELEX.

### 3.1.1.4 Élimination des sels et amplification par PCR de l'ADNsb élué

Après l'éluion, on procède à la collecte et la concentration des filtrats obtenus pour éliminer les tampons de lavage et d'éluion. La technique consiste à rajouter à chaque fois l'eau ultrapure pour se débarrasser des sels des tampons utilisés. Le lavage est effectué sur sept fois avec l'eau ultrapure et une centrifugation pendant environ six minutes est effectuée pour les six premiers lavages exclusivement pour le septième lavage, l'échantillon est centrifugé pendant 20 minutes.

Une fois la concentration et le lavage terminés, on procède à l'amplification en utilisant la technique PCR. Cette technique est basée sur le mécanisme de la réplication de l'ADN *in vivo* : l'ADN bicaténaire est déroulé en ADN monocaténaire, ensuite dupliqué et réenroulé. Le mélange PCR est préparé en utilisant 125  $\mu\text{L}$  de Taq buffer (10X), 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 nM), 25  $\mu\text{L}$  de dNTPS (10 nM), 15  $\mu\text{L}$  d'enzyme Taq polymérase, 50  $\mu\text{L}$  d'amorce vers l'avant (*Forward primer* ou *FWD-Flu*) qui est composé de 18 nucléotides et marqué par fluorescéine (5'-fluorescein- ATATCATATGCTCCAATT-3') et 50  $\mu\text{L}$  d'amorce inverse ou (*REV-polyA*) constitué de 18 nucléotides avec 20 adénines consécutives (Poly-dA20) (5'-Poly-dA20-HEGL18- ATATTACACTTGCGATCT-3'), HEGL18 est utilisé pour bloquer l'extension de l'enzyme polymérase. Après avoir mélanger les constituants de mélange PCR, un volume de 788  $\mu\text{L}$  d'eau ultrapure est rajouté, ensuite le contenu est agité à l'aide d'une mini centrifugeuse. Le mélange PCR est reparti sur 20 tubes de PCR sans oublier les deux contrôles positif et négatif avant de les placer dans l'appareil de PCR.

La PCR comprend plusieurs cycles répétitifs (Sambrook *et al.*, 1989). Dans ce projet, la PCR a été effectuée sous les conditions suivantes :

- 5 minutes à 94°C pour l'activation de l'enzyme polymérase et la dénaturation de l'ADN.
- 26 cycles de :
  - 1 minute à 94°C pour la dénaturation de la matrice ;
  - 1 minute à 47°C pour l'hybridation des amorces ;
  - 1 minute à 72°C pour l'élongation et l'extension des amorces.
- 10 minutes à 72°C pour une élongation finale.
- Temps indéterminé à 4°C pour maintenir le produit de la PCR à une basse température (refroidissement).

### 3.1.1.5 Dénaturation de l'ADN double brin à partir de produits de PCR par le gel de polyacrylamide

Les produits de PCR sont ensuite récoltés des tubes PCR dans des tubes eppendorf de 1,5 mL, ils ont concentrés par un *speedVac*. Un volume de (50 :50) d'eau ultrapure et de formamide est rajouté dans chaque tube eppendorf avant de les chauffer à 50°C pendant 5 minutes.

Le brin d'ADN marqué par la fluorescéine est séparé à partir du produit de PCR double brins par le gel de polyacrylamide 12% (PAGE 12%) composé de : 3 g d'Urea ; 2,25 mL d'acrylamide/bis-acrylamide (40%) ; 1,41 mL de TBE (5X) ; 1,31 mL H<sub>2</sub>O, 3,2 µL TEMED et 42,5 µL persulfate d'ammonium (APS, 10%). La séparation des deux brins d'ADN a été réalisée grâce à la technique d'électrophorèse en utilisant le TBE 1X comme tampon d'immigration.

À la fin, l'ADN est extrait du gel suite à son observation avec un détecteur UV, Le brin fluorescent est ensuite élué dans le tampon TE (1X) et prétraité (10 minutes à -80°C, 5 minutes à 55°C et 5 minutes à 90°C) pour qu'il soit incubé pendant 10-12 heures à 37°C.

Après l'incubation, l'ADNs dans le TE (1X) est concentré et lavé sept fois pour éliminer les sels par ultrafiltration, ensuite quantifié avec UV en utilisant le spectrophotomètre (*NanoPhotometer P330*) pour l'utiliser dans le prochain cycle.

Deux cycles de contre sélection ont été effectués en utilisant des perles de sépharose vierges sans DXN. Cependant, dans ce cas, l'ADN issu de lavage est récupéré, prétraité et amplifié pour l'utiliser dans les prochains cycles en utilisant les mêmes étapes décrites précédemment.

### 3.1.2 Clonage

Après l'obtention du plateau d'enrichissement d'ADNsb. La dernière série d'ADNsb issu du dernier cycle de SELEX est clonée en utilisant le kit de *TOPO TA* (Invitrogen) avec *pCR2.1-TOPO* vecteur. Dans la première étape, l'ADNsb est amplifié par PCR en utilisant des amorces non marquées. Après la PCR, on transfère 4  $\mu\text{L}$  du produit PCR avec 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  et 1  $\mu\text{L}$  de vecteur, le mélange est incubé à température ambiante pendant huit minutes. Un volume de 2  $\mu\text{L}$  est prélevé du mélange et transféré ensuite dans des tubes contenant les cellules compétentes et plus précisément des *E. Coli* (DH5AT1R et NEB10  $\beta$ ). Ces tubes sont mis à 4°C pendant 30 minutes et ensuite agités manuellement soigneusement avant d'être incubés encore une autre fois à 4°C pendant 30 secondes.

Les bactéries contenant les plasmides sont ensuite cultivées sur un milieu de gélose (LB) enrichi avec 200  $\mu\text{L}$  d'ampicilline (20 mg/mL) et 100  $\mu\text{L}$  d'IPTG-X-GAL. Les boîtes pétri sont incubées à 37°C pendant plus de 10 heures. La formation de colonies blanches et bleues après l'incubation indique la réussite du clonage. Les colonies blanches qui sont positives et contiennent une seule séquence d'ADNsb inséré dans leur plasmide sont récoltées des boîtes de pétri à l'aide des embouts de pipette pour ensuite cultivées dans des tubes contenant le liquide LB et incubés à 37°C pendant 10 heures. Après l'incubation et la croissance, une partie du plasmide sera amplifiée par PCR. Cette partie du plasmide est d'environ 300 nucléotides de taille et contient la séquence d'aptamère ADNsb que nous désirons amplifier.

Une fois l'amplification faite, on effectue une électrophorèse sur gel d'agarose pour déterminer la présence et la taille des produits de la PCR. Si le test est positif, on procède à la purification des produits de la PCR. Cependant, dans ce

projet, nous avons procédé à l'isolation des séquences amplifiées en utilisant le gel *native PAGE* 6% composé de 1,5 mL d'acrylamide/bis-acrylamide (40%) ; 4,5 mL de TBE (5X) ; 4 mL H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ L de TEMED et 56  $\mu$ L persulfate d'ammonium (APS, 10%). On récupère les séquences dont la taille est aux alentours de 300 paire de bases (300 bp) et on procède à la purification des séquences en utilisant un kit de purification (kit de purification *QIAquick PCR*). La figure 3.3 représente les différentes étapes du clonage.

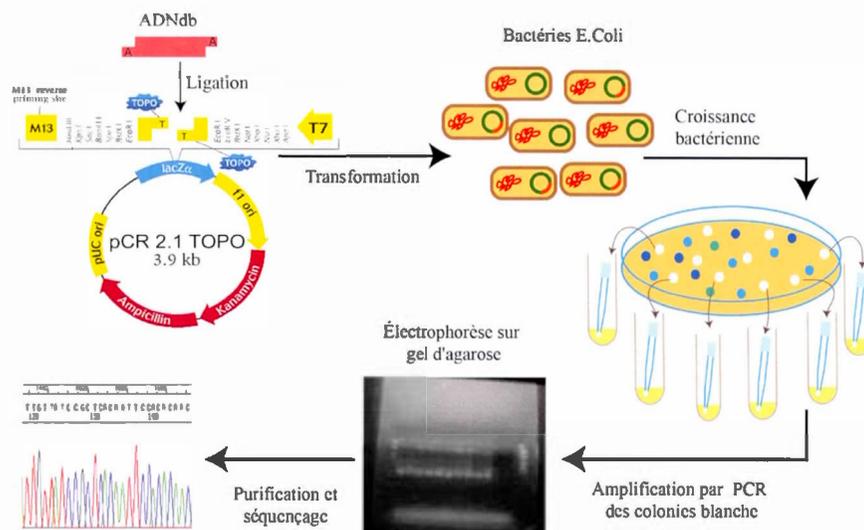


Figure 3.3: Différentes étapes de clonage des aptamères.

### 3.1.3 Purification et Séquençage

La purification a été réalisée avec le kit de purification PCR (*QIAquick PCR*). Ce kit contient trois tampons dont un tampon de liaison (PB), un tampon de lavage (PE) et un tampon d'élution (EB) qui sont utilisés dans trois étapes :

- Étape 01 : consiste au lavage avec le tampon PB en ajoutant cinq fois le volume du produit PCR et ensuite centrifuger à 1,3 rpm pendant 30-60 secondes. On jette le filtrat et on passe au deuxième lavage.

- Étape 02 : on rajoute 750  $\mu\text{L}$  de tampon PE dans les tubes et on centrifuge entre 30-60 secondes à raison de 1,3 rpm. Après la centrifugation, le filtrat est jeté et les tubes sont remis encore une autre fois à la microcentrifugeuse pendant une minute.
- Étape 03 : consiste à éluer les séquences d'ADNsb avec 50  $\mu\text{L}$  de tampon EB ou de l'eau ultrapure (pH 7,0-8,5) et à transférer l'élution dans des nouveaux tubes afin de mesurer la pureté des ADNsb.

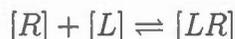
Finalement, une concentration de 2 ng/ $\mu\text{L}$  dans un volume de 10  $\mu\text{L}$  a été préparée pour toutes les séquences obtenues de clonage. Ces échantillons ont été envoyés pour le séquençage à l'Université de Laval (Québec, QC, Canada) pour qu'en suite soient analysées par le logiciel *Sequence scanner* et aligner à l'aide du logiciel *DIALIGN 2.2.1 ALGORITHM BiBiServ (Bielefeld University Bioinformatics server)* (Simossis *et al.*, 2005).

## 3.2 Caractérisation des aptamères obtenus

### 3.2.1 Détermination de l'affinité des aptamères et leur constante de dissociation

La constante de dissociation ( $K_d$ ) est une constante d'équilibre de la dissociation d'un complexe en ses composants. Cette constante est largement utilisée dans le domaine de chimie, biochimie ainsi qu'en pharmacologie pour mesurer la tendance d'un objet de se dissocier à l'inverse en éléments fins ou d'un complexe de se séparer en ses molécules constitutives tel qu'il est le cas des sels qui se dissocient en ions. Dans ce projet, nous étudions la force d'affinité des liaisons des aptamères sélectionnés à la DXN dans un complexe. Cette constante de dissociation est l'inverse de la constante d'association. La constante de dissociation ( $K_d$ )

peut être exprimée par l'équation non linéaire suivante :



$$[LR] = \frac{B_{max} \times [L]}{Kd + [L]}$$

Où :

- LR : représente la liaison spécifique entre l'aptamère et l'analyte.
- Bmax : c'est le nombre maximal des sites de liaison.
- L : c'est la concentration de ligand libre.
- R : c'est la concentration de récepteurs.
- Kd : c'est la constante de dissociation à l'équilibre. Sa valeur est la concentration en ligand libre lorsque le 50% des sites de liaison sont occupés.

La concentration [LR] pourrait être déterminée expérimentalement par plusieurs procédés, dont la spectroscopie d'impédance électrochimique ou la fluorescence. Cette dernière est la méthode utilisée dans ce projet. Les séquences d'ADNsb sont amplifiées par PCR en utilisant les mêmes conditions de protocole de SELEX et les mêmes amorces. Les simples brins d'ADN sont ensuite dénaturés par PAGE et électrophorèse afin d'être quantifiés par le spectrophotomètre.

Des concentrations comprises entre 50 nM et 500 nM des différents aptamères ont été prétraitées et incubées avec 20  $\mu$ L de perles DXN dans le tampon BB pendant deux heures à température ambiante. Les mélanges sont lavés avec le tampon BB et ensuite élués pour séparer les bons aptamères des analytes (DXN) et à la fin quantifiés en utilisant le fluorimètre. Une courbe de saturation a été obtenue pour chaque séquence, et les valeurs de *Kd* ont été respectivement calculées en utilisant la régression non linéaire.

## 3.2.2 Étude de la réactivité croisée par Fluorescence

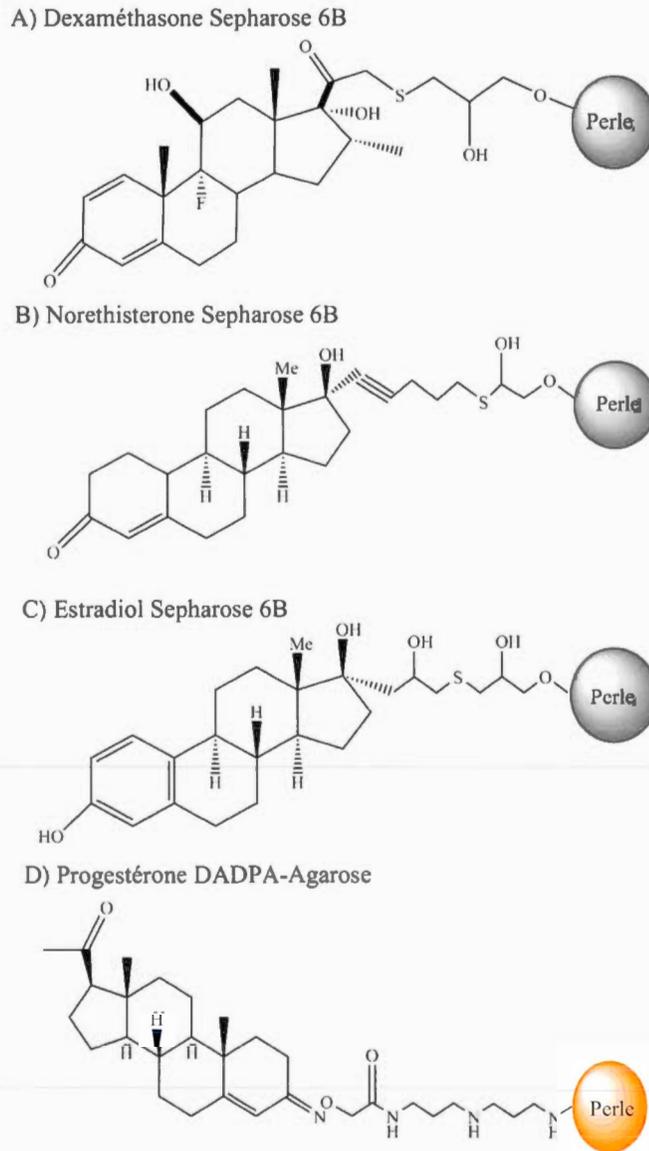


Figure 3.4: Différentes structures des analytes utilisés pour déterminer la réactivité croisée des aptamères.

La réactivité croisée a pour but la détermination de la spécificité des aptamères à la DXN. Cette technique fait référence à la capacité d'un aptamère à réagir avec

plusieurs analytes ou hormones dont la structure chimique est similaire à la DXN. Parmi ces hormones, la progestérone (P4), la noréthistérone (NET) et l'estradiol (E2) ont été utilisées dans cette étude comme analogues à la DXN (figure 3.4).

Après l'amplification des aptamère par PCR, une concentration de 150 nM ou 15 pmole de ces aptamères a été incubée avec 20  $\mu\text{L}$  de perles de P4 qui ont une capacité de charge de 4,4 nmol/mL et 5  $\mu\text{L}$  de billes de NET, E2 et DXN qui ont une capacité de charge des ligands de 6 à 14  $\mu\text{mol/mL}$ . Le pourcentage de liaison de chaque hormone avec les aptamères a été déterminé en mesurant à chaque fois la concentration de l'élution à l'aide de fluorospectromètre *NanoDrop 3300*.

### 3.2.3 Étude du changement conformationnel des aptamères avant et après la liaison à la DXN

Le changement conformationnel est mesuré par le dichroïsme circulaire (CD), qui est une technique spectroscopique. Cette technique est basée sur la capacité d'une molécule chirale en solution (ou placée dans un environnement asymétrique) d'absorber différemment et selon sa structure un faisceau lumineux polarisé circulairement à droite et un faisceau lumineux polarisé circulairement à gauche à travers un milieu optiquement actif (Middaugh *et al.*, 1998). En effet, le spectre obtenu, aussi nommé spectre dichroïque, correspond à la différence d'absorbance entre ces deux types de lumière ( $\Delta\epsilon = \epsilon_G - \epsilon_D$ ), en fonction de la longueur d'onde de la radiation. L'expression  $\Delta\epsilon$  est aussi appelé absorption dichroïque.

Ce spectre dichroïque est approprié pour juger l'état de repliement et la stabilité de la structure des aptamères face aux changements environnementaux. Dans ce cas, le dichroïsme circulaire va servir à déterminer le changement de conformation des aptamères avant et après la liaison à l'analyte DXN (figure 3.5).

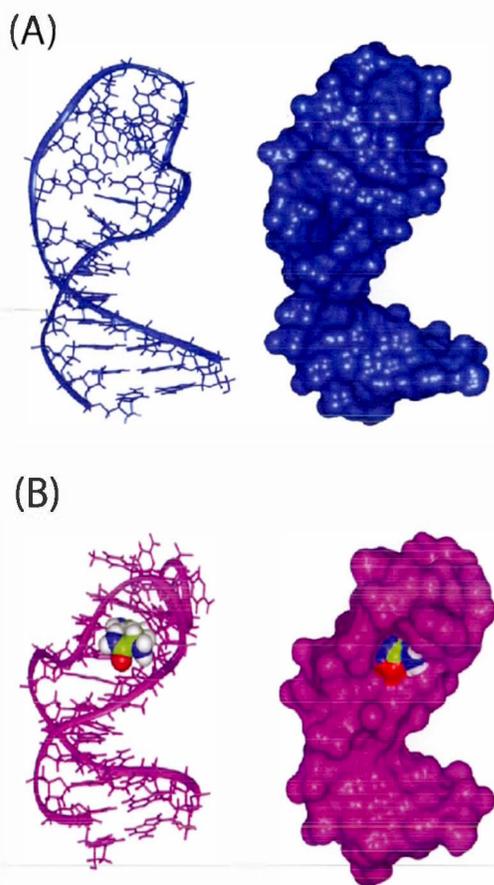


Figure 3.5: Changement de conformation d'un aptamère avant la liaison avec l'analyte (A) et après la liaison (B) (Bishop *et al.*, 2007).

Dans un premier temps, des solutions de  $3 \mu\text{M}$  dans  $2 \text{ mL}$  de chaque aptamère (DEX 01, DEX 03, DEX 04, DEX 05, DEX 06 et DEX 10) ont été préparées avec le tampon BB, et une solution de DXN de  $1 \mu\text{g/mL}$  a été aussi préparée. Une solution d'un volume de  $2 \text{ mL}$  (1 :1) contenant  $3 \mu\text{M}$  de chaque aptamères et  $2,35 \mu\text{L}$  de DXN avec une concentration de  $1 \mu\text{g/mL}$  a été incubée pendant 90 minutes afin de mesurer la conformation après la liaison. Toutes les mesures de CD ont été effectuées dans une longueur d'onde de  $200$  à  $320 \text{ nm}$  et analysées à l'aide de l'instrument *Jasco-815 CD* spectropolarimètre.

### 3.3 Application électrochimique de l'aptamère sélectionné à la DXN

#### 3.3.1 Préparation des électrodes et immobilisation des aptamères

Dans un premier temps, les électrodes de l'or (Au) de diamètre de 2 mm ont été nettoyées avec 1, 0,3 et 0,05  $\mu\text{m}$  de suspension d'alumine granulométrique ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) afin de bien nettoyer les électrodes (Au). Ces dernières ont été ensuite lavées et soniquées pendant 2 minutes dans de l'eau ultrapure. Les électrodes (Au) ont été par la suite immergées dans une solution piranha (constituée de 3 :1  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré et 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pendant 1 minute (pour éviter la gravure et l'oxydation de l'or (Fischer *et al.*, 2009)), puis lavées encore une autre fois avec de l'eau ultrapure et soniquées pendant 2 minutes dans l'éthanol (100%). Ensuite, les électrodes (Au) ont été nettoyées par voie électrochimique à travers la voltamétrie cyclique (CV) en utilisant une solution d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) à raison de 0,5 M. La CV est réalisée en appliquant un potentiel entre 0 à 1,6 V et 15 balayages complets à une vitesse de 100 mV/s jusqu'à l'obtention d'un voltammogramme stable. Ensuite, les électrodes ont été lavées encore une fois avec de l'eau ultrapure et séchées avec l'air ou l'azote. Juste après, Les électrodes (Au) ont été incubées dans une solution de 1  $\mu\text{M}$  de DEX 04 modifié avec un thiol (HO-C6-S-S-C6-DEX 04) dans le tampon BB pendant 24 heures à 25°C. Le but est de procéder à une immobilisation des aptamères sur la surface de l'électrode propre par auto-assemblage (SAM).

Subséquentement, les électrodes ont subi un lavage avec le tampon BB afin d'éliminer les aptamères non liés, et ensuite immergées dans 1  $\mu\text{M}$  6-mercapto-1-hexanol (MCH) dans 10 mM PBS (pH 7,4) pendant 30 minutes afin de bloquer d'une part les surface d'électrodes non couvertes et d'autre part réduire la densité des couches d'aptamères par déplacement des aptamères non spécifiquement adsorbés.

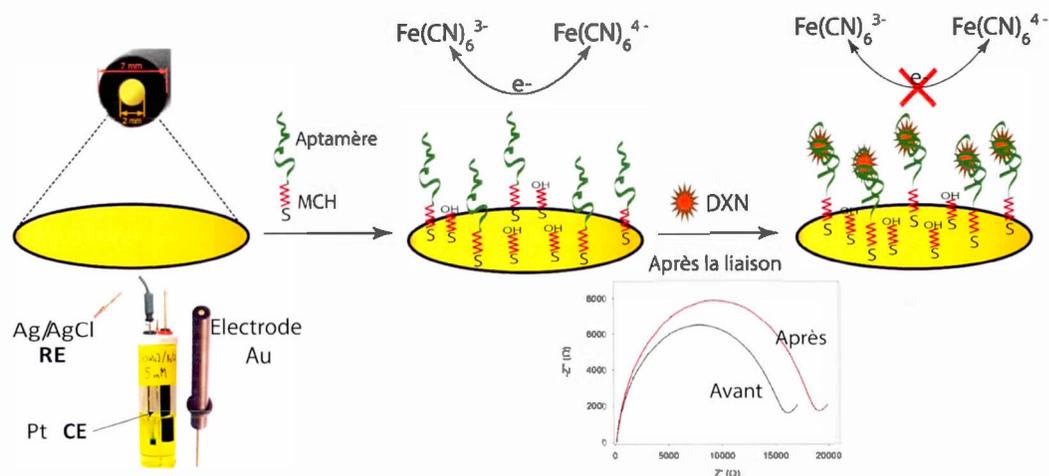


Figure 3.6: Mécanisme de la plateforme électrochimique pour la biodétection de la DXN.

À la fin, Les électrodes modifiées ont été lavées à fond avec du tampon BB et une solution de NaCl (1M) afin d'être immédiatement utilisées pour la détection de la DXN par des mesures électrochimiques (CV et SIE). Pour des utilisations ultérieures, les électrodes modifiées ont été maintenues dans le tampon BB à 4°C.

### 3.3.2 Incubation de la DXN

Pour effectuer la détection de la DXN, les électrodes "Au" modifiées avec HO-C6-S-S-C6-DEX 04 sont incubées à différentes concentrations de DXN dans un tampon BB allant de 0 nM à 400 nM pendant 100 à 120 minutes. Ensuite Les électrodes ont été bien lavées avec le tampon BB pour retirer la DXN libre non liée afin de soumettre des mesures relatives de CV et SIE. Une courbe d'étalonnage a été obtenue en traçant le pourcentage de variation de la résistance de transfert de charge en fonction de la concentration de DXN. La figure 3.6 montre un schéma illustratif de toutes les étapes de fabrication d'un aptacapteur.

### 3.3.3 Optimisation du temps d'incubation de DEX04 et DXN

La performance de l'aptacapteur pourrait être affectée par le temps d'incubation de l'aptamère avec l'analyte. Dans le but d'apporter un éclairage sur l'influence du temps d'incubation sur l'affinité de l'aptamère DEX 04 et d'optimiser les conditions de liaison, nous avons incubé les électrodes modifiées à HO-C6-S-S-C6-DEX 04 avec 50 nM de DXN pendant différentes durées allant de 10 minutes jusqu'à 200 minutes. Les complexes obtenus ont été ensuite analysés par les deux techniques électrochimiques CV et EIS.

### 3.3.4 Instrumentation et mesures électrochimiques

Les techniques électrochimiques utilisées (SIE et CV) ont été effectuées à température ambiante en utilisant une configuration à trois électrodes : Une électrode de platine comme une électrode auxiliaire, une électrode Ag/AgCl qui sert comme une électrode de référence et finalement une électrode d'or (Au) de 2 mm de diamètre comme électrode de travail. Toutes les expériences ont été effectuées dans une cellule en verre de 5 mL en utilisant les instruments *PGSTAT 302N Autolab potentiostat /galvanostat (EcoChemie, The Netherlands)* et *SP-300 potentiostat (Bio-Logic Science Instrument, France)*.

Pour les expériences de CV, une vitesse de balayage de 100 mV/s a été utilisée. Les résultats SIE sont enregistrés sur une plage de fréquences comprise entre 100 kHz et 50 mHz en utilisant une tension alternative avec une amplitude de 10 mV, superposée à un potentiel en courant continu de 0,21 V (par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl). Les données d'impédance sont représentées par des parcelles de Nyquist, qui sont ajustées en utilisant les logiciels *AUTOLAB*, *Nova 1,9* et *EC-Lab*. Toutes les mesures ont été effectuées dans du tampon PBS 10 mM, pH 7,4 en présence de Ferricyanure  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  comme couple redox.

### 3.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté l'approche utilisée pour développer notre aptamère afin de l'intégrer par la suite dans une plateforme électrochimique dans le but de détecter la DXN dans l'eau. Notre approche proposée est fondée sur trois étapes essentielles dont la sélection des aptamères par la technique SELEX, leur caractérisation et finalement l'application électrochimique pour la détermination de la limite de détection de l'aptacapteur, ainsi le potentiel d'emploi de cet aptacapteur pour des analyses environnementales.

## CHAPITRE IV

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre est consacré à l'analyse et à l'évaluation des résultats obtenus pour l'aptacapteur développé. Dans un premier temps, nous commencerons par la présentation des résultats du SELEX, du clonage et du séquençage des aptamères sélectionnés. Par la suite, nous déterminerons leur affinité et leur spécificité. Enfin, nous étudierons le changement de leur conformation avant et après la liaison à la DXN dans le but de choisir le bon aptamère pour l'application électrochimique. Pour terminer ce chapitre, nous déterminerons la limite de détection de l'aptacapteur développé et l'optimisation du temps d'incubation. Nous vérifierons également sa spécificité par rapport aux autres analogues et nous effectuerons de même des tests sur différents échantillons d'eau afin de valider l'utilisation et l'emploi de cet aptacapteur dans des analyses environnementales réelles.

#### 4.1 Sélection des aptamères

##### 4.1.1 Sélection *in vitro* des aptamères par SELEX

Afin de réaliser les cycles de SELEX pour des petites molécules, il faut que l'analyte soit immobilisé sur un support solide. Dans ce projet, nous avons utilisé les molécules de DXN couplées à des perles de sépharose (3.2). L'immobilisation est faite d'une manière simple afin de garder tous les groupes fonctionnels de la

molécule de DXN disponibles pour toutes possibilités de liaison avec les aptamères.

La sélection des aptamères a été réalisée à travers 19 cycles de sélection *in vitro* et deux cycles de sélection négative. Les cycles ont été effectués selon le processus illustré dans la figure 3.1. Dans le premier cycle, une grande bibliothèque aléatoire d'aptamères comprenant  $1,08 \times 10^{15}$  séquences aléatoires a été incubée avec 50  $\mu\text{L}$  de perles DXN. Par la suite, les séquences liées et celles non liées ont été séparées par lavage avec le tampon de liaison. Chaque cycle de sélection a été contrôlé en suivant le pourcentage des aptamères liés à l'analyte par rapport à la concentration initiale des aptamères avant la liaison quantifiée auparavant par fluorescence.

Comme le montre la figure 4.1, un très faible pourcentage de rendement a été obtenu pendant les premiers cycles. Cela a pu être causé par la qualité des analytes utilisés ou par le pourcentage plus faible des aptamères liés spécifiquement aux analytes. Un bon pourcentage de récupération d'ADNsb a été observé dans le septième cycle dû à l'enrichissement de l'ADNsb lié à la DXN à ce stade. On a supposé que ce taux de récupération élevé a été attribué à la sélection négative effectuée avant le sixième cycle avec les perles de sépharose vierges. Cette sélection a aussi permis d'éliminer les séquences liées non spécifiquement à la DXN.

Une deuxième sélection négative a été effectuée avant le dixième cycle. Un blocage des perles et une diminution significative de la récupération ont été par la suite observées. Une grande partie d'ADNsb a été retenue sur les perles vierges, tandis qu'un faible pourcentage d'ADNsb a été jugé spécifique à l'analyte DXN. Cette étape nous a confirmé le rôle crucial de la sélection négative dans l'élimination des séquences qui se lient aux perles de sépharose. On a observé après une augmentation progressive de l'ADNsb récupéré dans le 11<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> cycles.

Une diminution significative dans le 13ème cycle est traduite par la diminution de la quantité des analytes DXN utilisés. Cette diminution permet de bien sélectionner les aptamères hautement spécifiques à la DXN. Cependant, une augmentation remarquable du pourcentage de récupération de l'ADN a été observée à nouveau dans les cycles qui suivent jusqu'à l'obtention d'un plateau et l'enrichissement de notre bibliothèque. Cette augmentation démontre la spécificité de cette faible proportion d'ADNs<sub>b</sub> à la DXN.

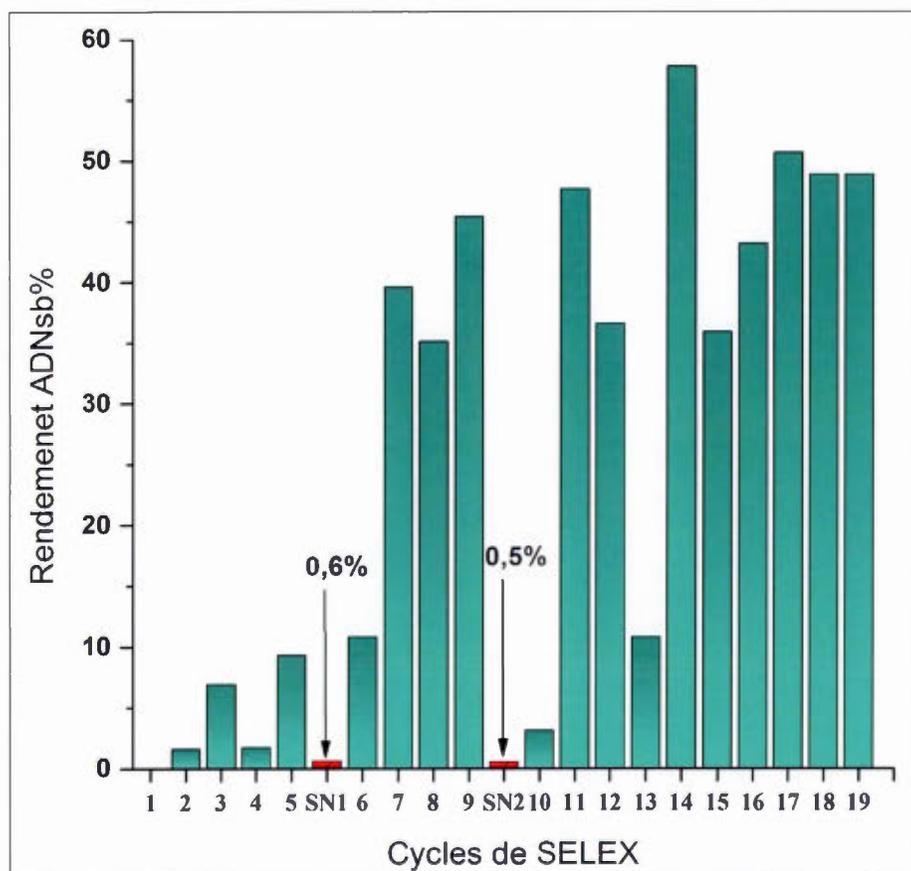


Figure 4.1: Enrichissement des aptamères spécifiques à la DXN par SELEX.

Au 19<sup>ème</sup> cycle de SELEX, nous avons constaté que le pourcentage de récupération d'ADNsb est pratiquement stable. Ainsi, nous avons arrêté le processus de sélection et les séquences d'ADNsb obtenues ont été clonées et séquencées puis identifiées, alignées, et regroupées en catégories selon les groupements et les motifs en commun qu'elles contiennent.

#### 4.1.2 Clonage et séquençage

Les aptamères du dernier cycle de SELEX ont été amplifiés avec des amorces inconnues et clonés en utilisant le vecteur pCR2.1-TOPO et suivant le protocole TOPO TA. Deux catégories de colonies ont été trouvées : bleue et blanche (figure 3.3). Dix colonies blanches ont été obtenues, ces dernières qui ont des bactéries avec une seule séquence insérée dans leur plasmide, ont été récupérées et cultivées directement dans le liquide LB à 37°C sous agitation douce pendant une nuit. Ensuite, une aliquote a été prélevée de chaque tube afin d'amplifier la séquence insérée dans la région du plasmide par PCR. Les fragments d'ADN résultants ont été confirmés par une électrophorèse sur gel d'agarose à un niveau de 300 paires de bases (300 pb). Tous les clones ont été séquencés et alignés afin d'être regroupés selon leurs similitudes.

Les séquences ou les aptamères obtenus ont été prétraités en utilisant le logiciel *Sequence scanner*, puis regroupés en fonction de leurs similitudes, grâce au logiciel *DIALIGN2.2.1. ALGORITHM BiBiServ*. Parmi les dix colonies, seulement six séquences ont été identifiées et regroupées en trois grands groupes. Le tableau 4.1 présente la composition des séquences et les groupes de même similarité. Les séquences ont été nommées respectivement DEX 01, DEX 03 DEX 04, DEX 05, DEX 06, DEX 10. Elles ne présentent pas des grandes parties de ressemblance, seulement dans quelques régions où les nucléotides sont similaires. Cependant, elles

sont toutes composées de 60 nucléotides sauf la séquence DEX 04 qui contient 59 nucléotides.

Tableau 4.1: Les séquences d'aptamère sélectionnées contre la DXN.

Catégories	Nom	Séquences
A	DEX 01	ACACCCCACGTAGTGTCCACAGCACGCTTATAGTAA GTGAAGTGACGGGTTGCTGATGTG
	DEX 03	ACGCGTAGGGATGTGTAAGGTCTGTACACCTCGGT TTACTCTATGCTTCGCATATTGTGCG
B	DEX 04	ACACGACGAGGGACGAGGAGTACTTGCCAACGAT AACGTCGTTGGATCTGTCTGTGCCC
	DEX 10	GGACAGCTGGCCGCGAAGCGAGACACGTATAAGG TACTATACGGCTGGCATATGTATCTG
C	DEX 05	ACAGGCTTGGATTAGTGTATCCAACACTAGTATCGTGT ATACTAGGCCCTTGCTACCCTGTG
	DEX 06	ACACACGAAACACAAGCAGTGAGACTGCCTACGT CCGTAGTTGTGTTGAGTTTGCTCTCC

#### 4.1.3 Structure secondaire des séquences qui ont montré une bonne affinité à la DXN

Afin d'étudier les aptamères issus de la technique SELEX, il est nécessaire de connaître leur structure secondaire, pour bien contrôler leurs propriétés. La structure secondaire nous renseigne toujours sur l'enchaînement et la classification des bases. Cet ensemble d'appariements induit des courbures importantes dans la molécule qui permettent la formation d'une topologie particulière, constituée de région en hélice (tiges) et de régions non-appariées (boucles), permettant la liaison avec la DXN.

La figure 4.2 illustre les structures secondaires des six séquences obtenues. On remarque également qu'il y a une similarité dans la forme des séquences DEX 03, DEX 04 et DEX 10 par rapport aux autres vu qu'elles contiennent une boucle interne ou multiple, des tiges et des boucles terminales situées à l'extrémité des tiges. On observe aussi les régions ou les nucléotides sont semblables dans chaque catégorie. Ces six séquences ont été par la suite caractérisées en déterminant leur affinité et spécificité par fluorescence et leur changement conformationnel par CD.

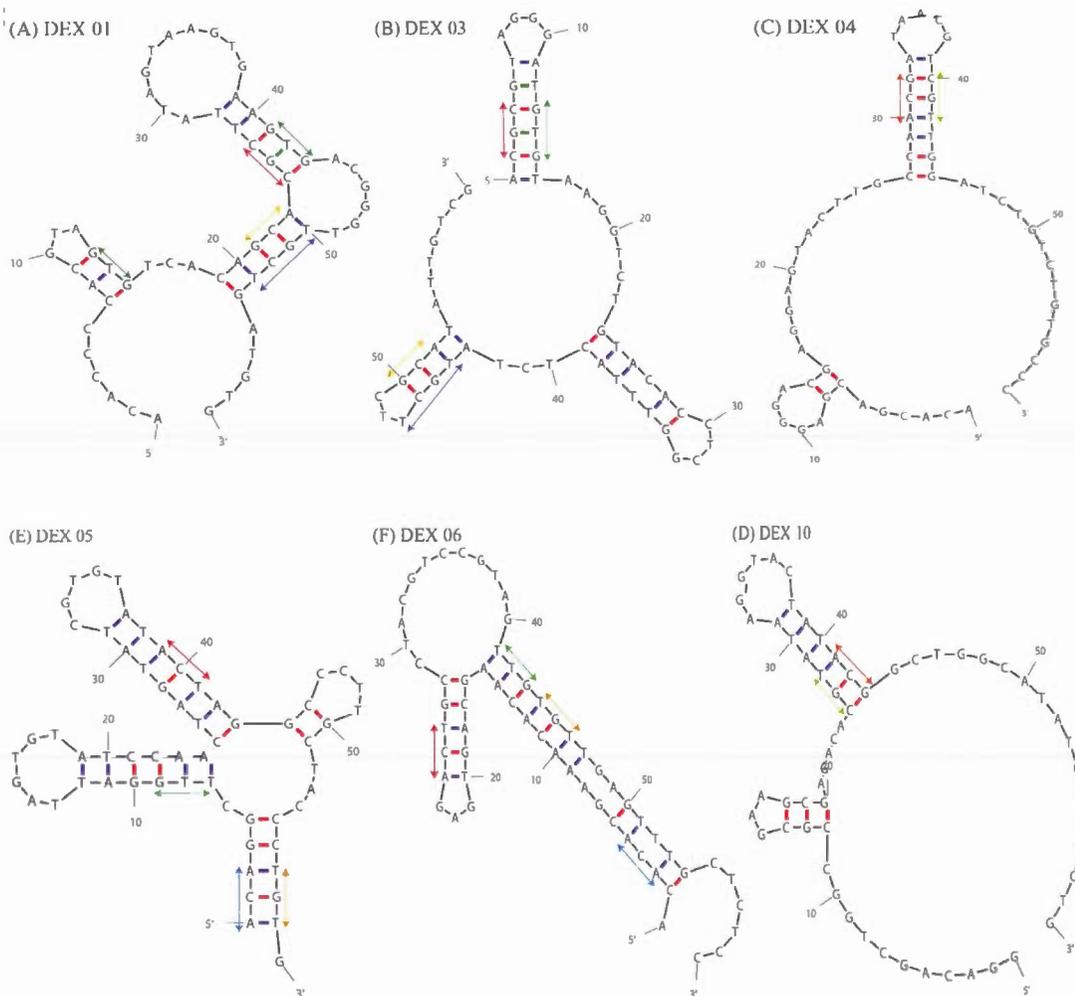


Figure 4.2: Représentation schématique des structures secondaires des six aptamères sélectionnés contre la DXN.

## 4.2 Caractérisation des aptamères obtenus

### 4.2.1 Détermination de la constante de dissociation $k_d$ et l'affinité des aptamères par fluorescence

Après le séquençage et l'identification des séquences, la caractérisation constitue une étape aussi importante afin d'en choisir le meilleur aptamère. Déterminer la constante de dissociation nous permet de classer aussi les aptamères selon leur affinité. En premier, les perles de DXN ont été incubées avec différentes concentrations d'aptamères DEX 01, DEX 03, DEX 04, DEX 10, DEX 05, DEX 06 allant de 50 nM à 500 nM. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 4.3 et le tableau 4.2. Les courbes de saturation ainsi que les valeurs de  $K_d$  ont été traitées et déterminées par le logiciel *GraphpadPrism5*.

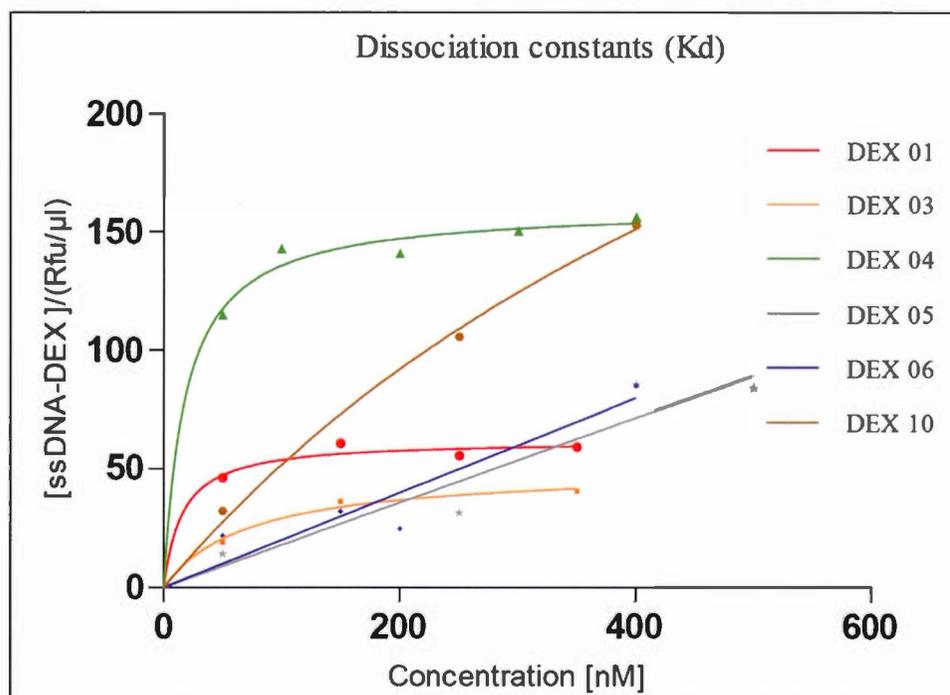


Figure 4.3: Détermination de la constante d'affinité  $K_d$  de la liaison des aptamères avec la DXN par fluorescence.

Tableau 4.2: Valeurs de la constante de dissociation  $Kd$  des six séquences.

Séquences	Kd (nM)	Bmax (RFU)
DEX 01	15,71 ± 7,88	62,22 ± 3,71
DEX 03	72,83 ± 26,82	50,36 ± 5,79
DEX 04	18,35 ± 4,54	160,5 ± 5,19
DEX 05	ambiguë	ambiguë
DEX 06	ambiguë	ambiguë
DEX 10	715 ± 383,8	421 ± 154,5

Les séquences DEX 01, DEX 04 et DEX 03 ont montré une grande affinité avec une faible valeur de  $Kd$  (15,71 nM, 18,35 nM et 72,83 nM) respectivement. Cependant, les valeurs ambiguës des séquences DEX 05 et DEX 06 représentent une liaison non spécifique de ces dernières à l'analyte. Ceci indique une liaison avec les perles de sépharose. La séquence DEX 10 a une valeur de  $Kd$  de 715 nM, qui est plus élevée comparativement aux autres séquences.

Les séquences qui ont montré une affinité élevée contre la DXN ont été utilisées afin de déterminer leur spécificité et leur changement conformationnel avant et après la liaison à la DXN. Le but était d'identifier la séquence la plus appropriée pour la DXN.

#### 4.2.2 Détermination de la spécificité et de la réactivité croisée des aptamères

Un aptamère ayant une bonne affinité envers la DXN, ne signifie pas qu'il est spécifique à celle-ci. En effet, il peut avoir une réactivité croisée avec d'autres analytes analogues. Pour étudier la spécificité des aptamères, une série d'expériences ont été réalisées en incubant les séquences DEX 01, DEX 03, DEX 04 et DEX

10 avec la DXN, la progestérone (P4), la noréthistérone (NET) et l'estradiol (E2) qui sont des analytes analogues à la DXN. Les séquences DEX 05 et DEX 06 ont été exclues vu qu'elles présentent une liaison non spécifique à la DXN.

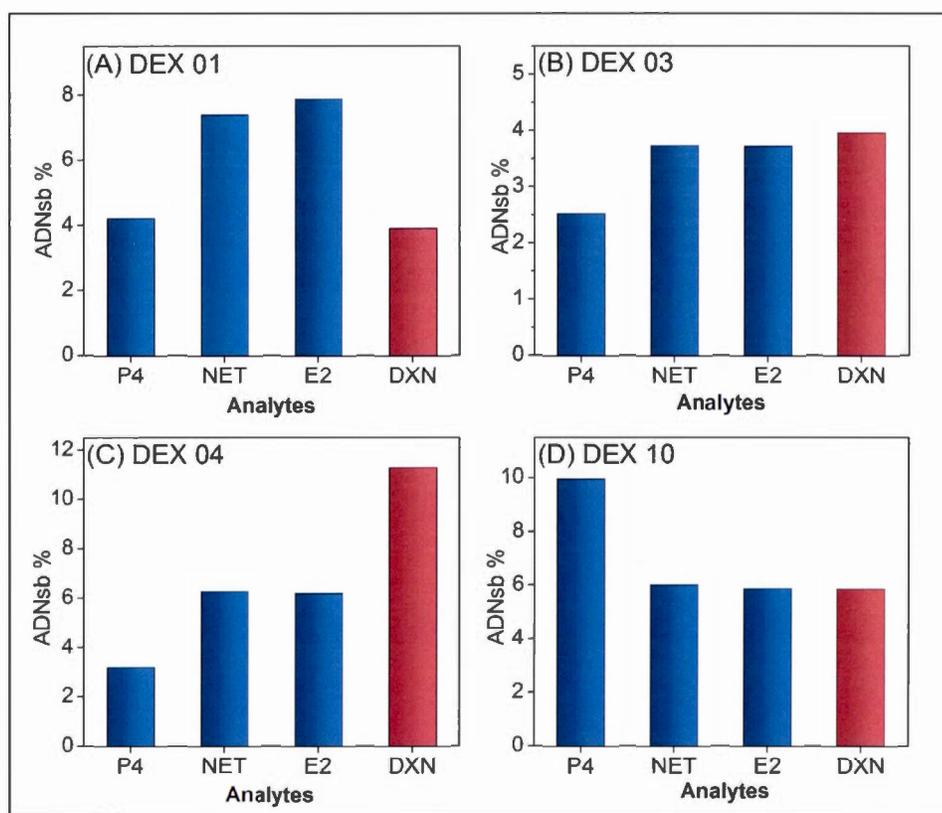


Figure 4.4: Étude de la réactivité croisée des séquences DEX 01, DEX 03, DEX 04 et DEX 10 par fluorescence.

L'expérience a confirmé que l'aptamère DEX01, malgré qu'il a une bonne affinité envers la DXN, n'est pas spécifique à cet analyte. La figure 4.4 (A) montre que le pourcentage de liaison aux autres analogues est supérieur au pourcentage de liaison à la DXN. De même, l'aptamère DEX 10 montre une spécificité à la P4 au lieu de la DXN (figure 4.4 (D)).

La séquence DEX04 présente une bonne spécificité à la DXN avec un pourcentage de liaison de 12% qui est supérieur par rapport aux pourcentages des autres hormones. Cela peut être expliqué par les différents groupements fonctionnels similaires entre les différentes hormones mais aussi par la capacité de charge des ligands de chaque hormone. En revanche, l'aptamère DEX 03 a montré une légère spécificité à la DXN avec un pourcentage de liaison qui n'est pas trop élevé comparativement à l'aptamère DEX 04 (figure 4.4). On conclut que le test de spécificité nous a montré que seulement les aptamères DEX 03 et DEX 04 ont une bonne affinité et spécificité à la DXN par rapport aux autres hormones analogues utilisées dans cette étude.

#### 4.2.3 Changement conformationnel des aptamères avant et après la liaison

Les aptamères sont des macromolécules souvent flexibles. Leur structure 3D peut changer de conformation suite à la modification de plusieurs paramètres, comme la température, le pH, la tension, la concentration en ions et la liaison d'un ligand. Parce que notre objectif était d'appliquer l'un des aptamères sélectionnés dans une plate-forme de détection sans étiquette, il était important d'étudier le changement conformationnel de tous les aptamères obtenus avant et après la liaison à la DXN avec la spectroscopie de dichroïsme circulaire.

La figure 4.5 montre deux spectres de CD pour chaque aptamères. Un spectre avant la liaison et l'autre après la liaison avec la DXN. Tous les spectres sont composés de deux pics, dont un négatif et un positif. On remarque pour les séquences DEX 01, DEX 03, DEX 05, DEX 06 et DEX 10 qu'il y a eu un changement léger avant et après la liaison. En revanche, pour les séquences DEX 05 et DEX 06 un changement non significatif a été observé, ce qui peut confirmer la non spécificité et la faible affinité de ces deux aptamères à l'analyte DXN. Le spectre de la sé-

quence DEX 04 par contre présente à son tour un changement remarquable après la liaison à la DXN.

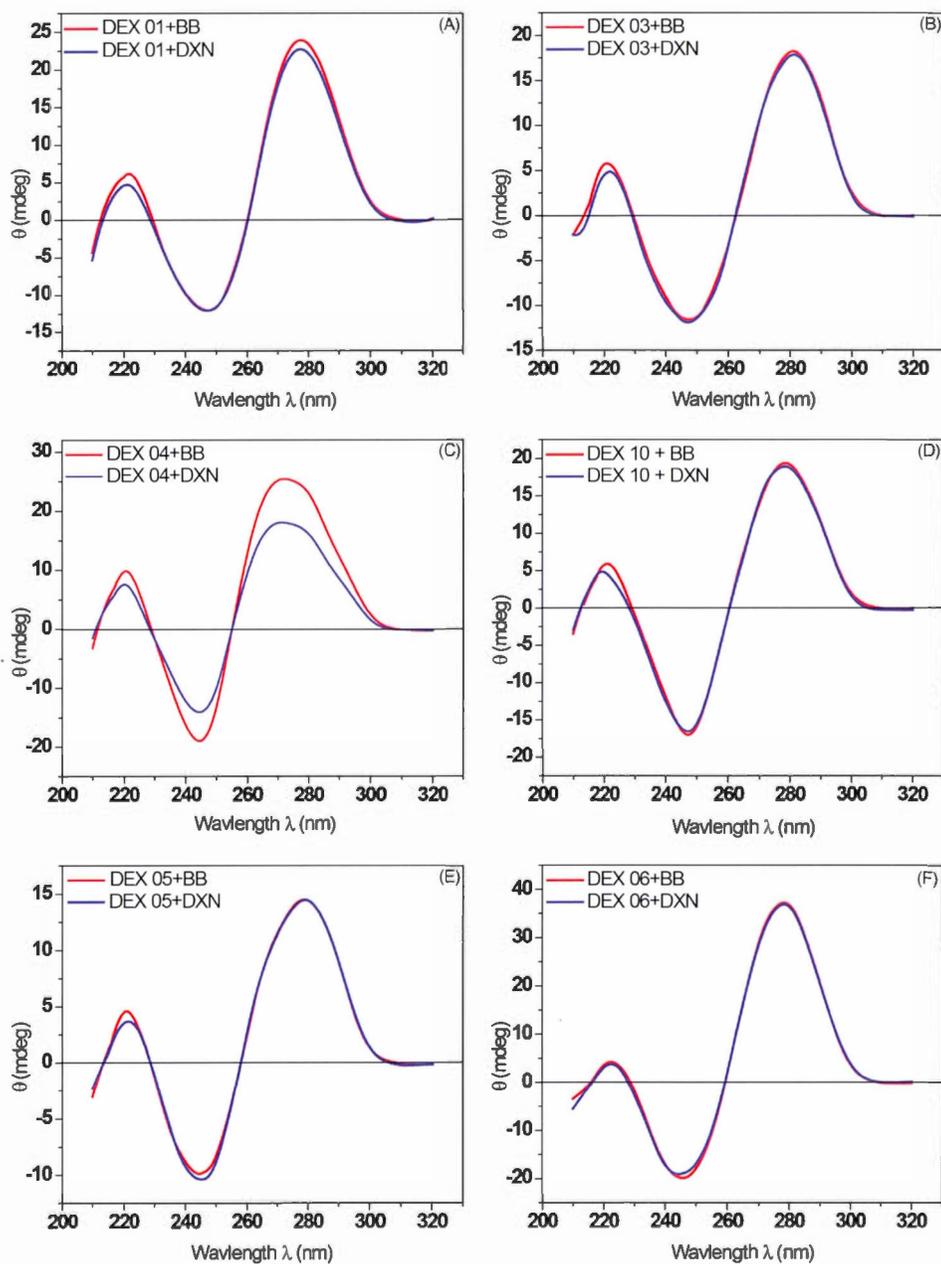


Figure 4.5: Spectres de dichroïsme circulaire de DEX 01 (A), DEX 03 (B), DEX 04 (C), DEX 10 (D), DEX 05 (E) et DEX 06 (F) avant et après liaison à la DXN.

Le spectre de CD de l'aptamère DEX 04 libre a montré un pic positif à 271 nm et un pic négatif à 244,5 nm, qui est une caractéristique de type  $\beta$  duplex (Petersen *et al.*, 2002). Suite à la liaison et la biorecognition de l'aptamère DEX04 à la DXN, une diminution significative et un petit passage de l'ellipticité à 271 et 245,5 nm a été observé. Ceci indique le pliage de l'aptamère dans différentes conformations suite à son contact à la molécule de DXN, qui contient des atomes chiraux et pourraient dévier la lumière polarisée circulairement.

#### 4.3 Application électrochimique de l'aptamère développé pour la biodétection de la DXN

Pour l'aptacapteur de DXN, la séquence DEX 04 (HO-C6-S-S-C6-5'-ACA CGA CGA GGG ACG AGG AGT ACT TGC CAA CGA TAA CGT CGT TGG ATC TGT CTG TGC CC-3'), a été choisie pour la conception d'un aptacapteur sans étiquette basé sur la spectroscopie d'impédance électrochimique comme mode de détection. Ceci est en raison de sa grande affinité et spécificité, ainsi a montré un changement de conformation important dans le CD.

Tout d'abord, l'aptacapteur a été fabriqué par l'immobilisation de l'aptamère modifié avec un thiol sur une surface d'or par l'adsorption chimique. Puis, nous avons utilisé le mercaptohexanol (MCH) afin de minimiser l'adsorption non spécifique des aptamères sur l'électrode d'or, et ce en déplaçant les aptamères de la surface (Au) afin de garder seulement les aptamères qui ont été liés par liaison covalente à l'intermédiaire de ses groupements thiols. Cette conformation permet de renforcer la formation de la structure secondaire de l'aptamère afin de faciliter le phénomène de biorecognition de son ligand. Pour connaître les conditions préliminaires de la détection, les aptamères (HO-C6-S-S-C6-DEX 04) immobilisés sur les électrodes d'or ont été incubés avec 50 nM et 100 nM de DXN en premier temps pendant 100 min. Après rinçage avec le tampon BB (pour retirer la

DXN non spécifiquement lié), les électrodes ont soumis directement des mesures d'impédance.

Dans le but de clarifier les propriétés électrochimiques du l'aptacapteur résultant, le processus de fabrication de cet aptacapteur après chaque étape de modification est étudié par CV et EIS. Comme le montre la Figure 4.6, les caractéristiques des pics d'oxydoréduction de ferricyanure obtenus avec des électrodes d'or (Au) non traitées sont diminuées progressivement après l'exposition au MCH, à l'aptamère (HO-C6-S-S-C6-DEX 04) et à l'aptamère après la liaison avec la DXN. Pour l'électrode (Au) non fonctionnalisée (nue), un voltamogramme quasiréversible caractéristique du couple d'oxydoréduction du cyanure ferrique est obtenu avec un pic de séparation de  $\Delta E_p$  de 120 mV. Ce dernier est représenté sur la figure 4.6 (la courbe noire).

Après la modification par MCH, la réaction électrochimique est bloquée à l'électrode (Au), ce qui a engendré une augmentation de la séparation des pics et une diminution considérable du courant de crête (la courbe rouge). Lorsque l'électrode (Au) a été incubée dans  $1\mu\text{M}$  de (HO-C6-S-S-C6-DEX 04) et suivie d'une couche de blocage de MCH (courbe bleue), l'inhibition du transfert d'électron du couple d'oxydoréduction augmente. Cela pourrait être dû à la génération d'une interface chargée négativement de l'ossature de phosphate de l'ADN qui repousse les anions  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$  et retarde la cinétique interfaciale du couple d'oxydoréduction à l'interface de l'électrode (Au). En outre, le pic de courant reflète une diminution supplémentaire du taux de transfert d'électrons après le rajout de 100 nM de DXN (courbe verte), ce qui confirme le succès de la liaison de la DXN à la surface de l'aptacapteur.

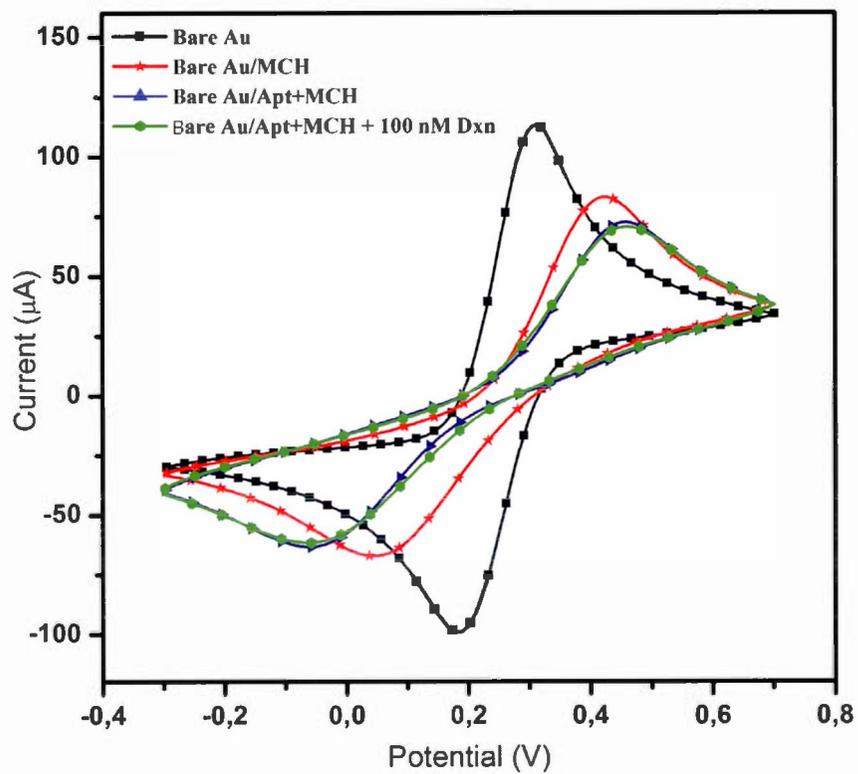


Figure 4.6: Voltammogrammes cycliques de 10 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$

l'électrode. En outre, le circuit comprend la résistance de la solution entre les électrodes de travail et de référence  $R_s$ , l'impédance Warburg  $Z_W$  qui résulte de la diffusion des ions à l'interface de la masse de l'électrolyte et l'élément de phase constante QDL (variante de la capacité double couche,  $C_{dl}$ ), qui se rapporte directement à la rugosité de la surface de l'électrode.

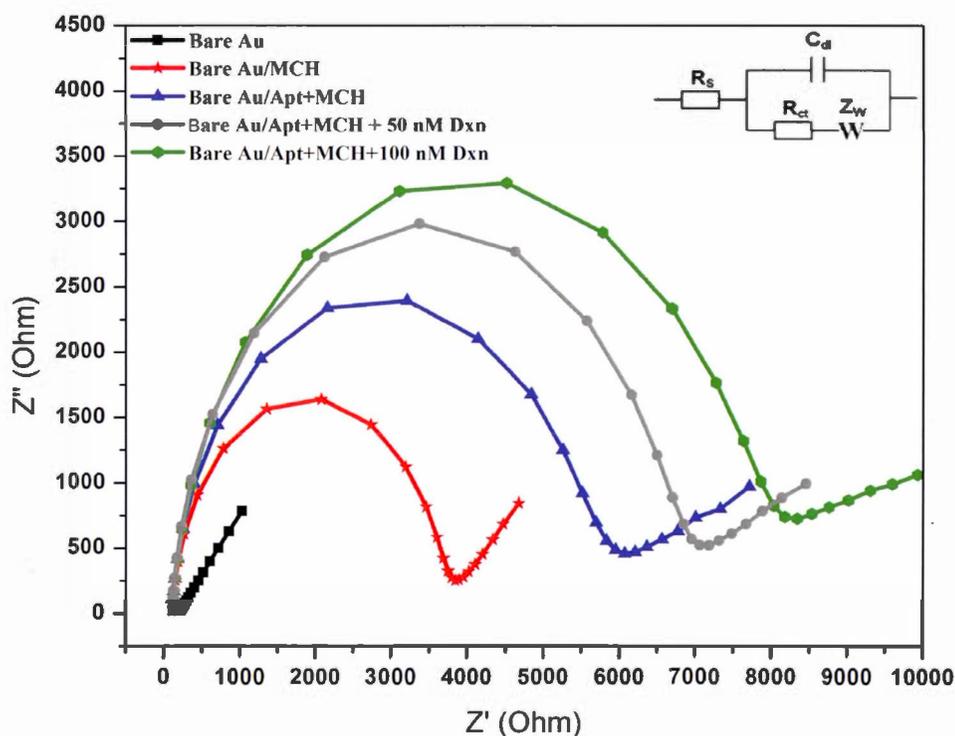


Figure 4.7: Parcelles de Nyquist pour les mesures d'EIS en utilisant les mêmes paramètres que dans la CV.

Tel que démontré par la figure 4.7, les résultats de la spectroscopie d'impédance obtenus confirment les résultats précédents obtenus par CV. Un transfert d'électrons rapide et une diffusion des processus de limitation ont été enregistrés sur l'électrode non fonctionnalisée, ce qui est traduit par un faible diamètre de demicercle (courbe noire). Par la suite, la réaction électrochimique a été bloquée

à l'électrode (Au) après sa modification avec le MCH. Ce blocage est traduit par une augmentation de la résistance de transfert de charge ( $R_{et}$ ). Après l'immobilisation de l'aptamère suivie de blocage MCH, la résistance de transfert de charge du couple redox à l'électrode d'or serrée a augmenté. Ceci est provoqué par l'assemblage d'un disulfure chargé négativement sur la surface de l'électrode (Au). Une nouvelle augmentation significative de  $R_{et}$  (7810  $\Omega$ ) a été remarquée après l'ajout de 50 nM de DXN. Ceci peut provenir du changement de la conformation de l'aptamère suite à sa liaison avec la DXN, ce qui à son tour réduit l'accessibilité du couple redox à la surface de l'électrode. Lorsque nous avons augmenté la concentration de DXN à 100 nM, nous avons observé une légère augmentation supplémentaire de  $R_{et}$ . Les résultats des deux techniques CV et SIE, confirment que l'interface de détection est réalisée avec succès.

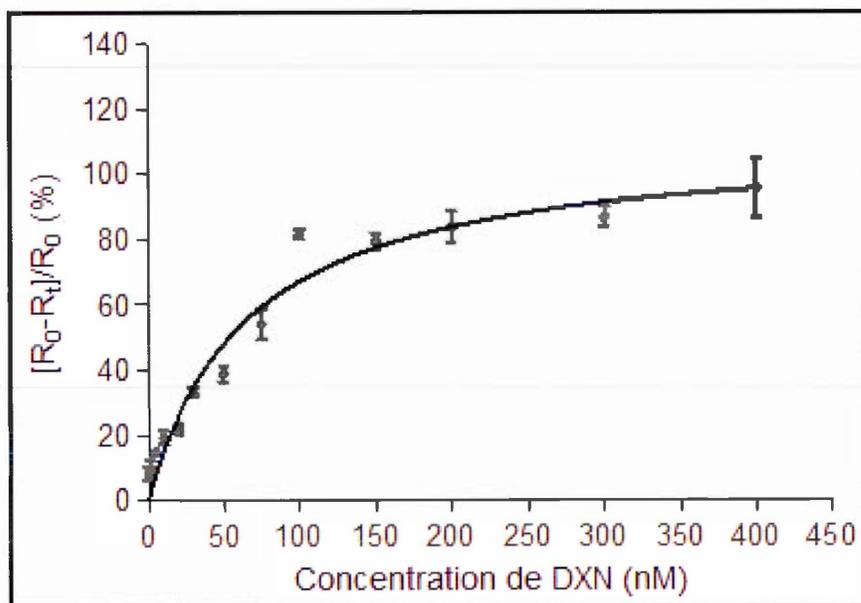


Figure 4.8: Courbe d'étalonnage correspondant à  $(R_{et} - R_0)/R_0\%$  par rapport à la concentration de DXN (nM).

L'aptacapteur a été utilisé pour enregistrer les réponses impédimétriques pour diverses concentrations de DXN dans des conditions optimales. En augmentant la concentration de DXN, l'aptacapteur enregistre une augmentation de la résistance interfaciale de transfert d'électrons,  $R_{et}$ . Ainsi, le paramètre  $R_{et}$  a été utilisé comme signal de lecture afin de quantifier le taux des analytes reconnus sur la surface de l'aptacapteur, tel qu'illustré par la figure 4.8.

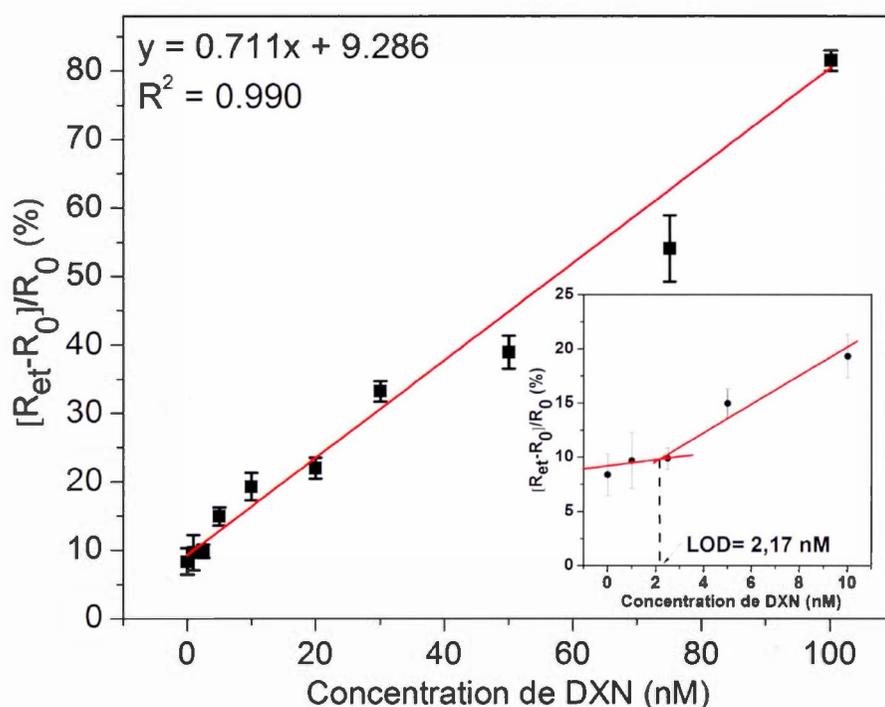


Figure 4.9: Courbe de calibration pour déterminer la limite de détection de l'aptacapteur envers la DXN.

La figure 4.9 montre la courbe de calibration obtenue avec la méthode de régression linéaire. Une bonne corrélation linéaire ( $R=0,99$ ) existe entre la valeur de réponse du capteur  $[R_{et}-R_0]/R_0\%$  et la concentration de DXN sur une plage de 2,5 nM à 100 nM. Les points de la courbe d'étalonnage représentent une moyenne

de trois mesures indépendantes avec un écart-type relatif de 0,97% à 9,4%, ce qui est représenté sous forme de barres d'erreur sur la courbe. La barre d'erreur est le RSD de la moyenne de ces trois mesures. Selon la recommandation IUPAC de 1994 (Buck et Lindner, 1994), nous avons estimé que la limite de détection (LOD) de notre aptacapteur pour la DXN est de 2,17 nM ce qui est équivalent à 0,85 ng/mL. Notons que cette concentration est acceptable puisque elle est inférieure à la concentration minimale qui peut causer des effets néfastes sur les organismes vivant soit de 50  $\mu\text{g/L}$  (LaLone *et al.*, 2012). Comparativement aux limites obtenues avec les autres techniques, telle que celle de l'immunocapteur photoélectrochimique basé sur la stratégie concurrentielle qui a été estimée à 2 pg/mL dans des échantillons de lait (Wang *et al.*, 2015) et celle obtenue avec le dosage CALUX qui est de l'ordre de 0,39 à 1,3 ng/L dans les eaux de surface et de 11 à 243 ng/L dans les effluents municipaux. Cependant, ces deux méthodes sont généralement coûteuses et réalisées *in vivo* ce qui implique la nécessité des animaux pour leur réalisation. En effet, le dosage CALUX, non seulement il utilise des gènes et des cellules animales, mais aussi des techniques cinématographiques de référence pour la confirmation et le contrôle de qualité. Bien que la limite de détection de notre approche soit un peu élevée par rapport aux techniques précédentes, elle reste toujours compétitive en raison de la simplicité, la rapidité, le faible coût qu'offre notre aptacapteur. Notons aussi que l'aptacapteur développé est écologique car il ne représente aucun danger sur l'environnement et les êtres vivants.

#### 4.4 Optimisation de temps d'incubation sur l'aptacapteur

Les performances de l'aptacapteur pourraient être affectées par le temps d'incubation de l'aptamère DEX 04 avec l'analyte DXN. La figure 4.10 montre les réponses de l'aptacapteur avec 50 nM de DXN à différents temps d'incubation allant de 10 à 240 minutes.

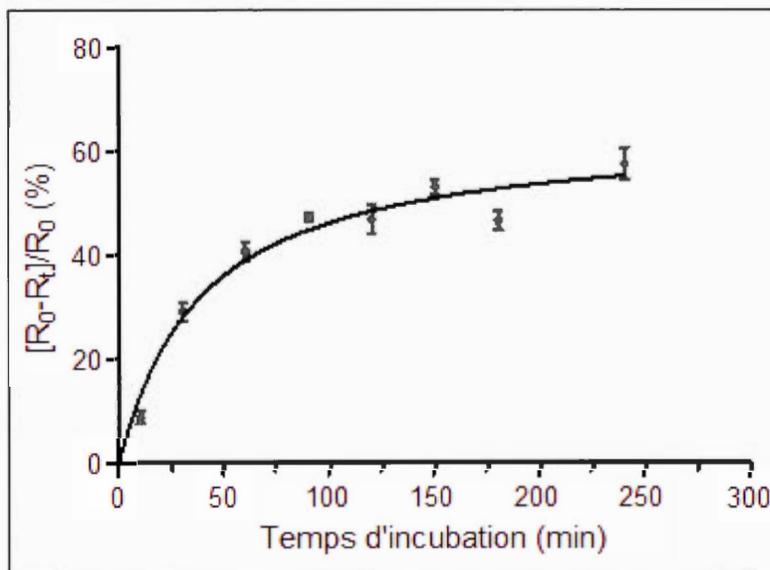


Figure 4.10: Effet de temps d'incubation de DXN sur la réponse de l'aptacapteur envers 50 nM DXN dans 10 mM  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ , 10 mM PBS (pH 7,4).

La réponse de l'aptacapteur  $[(R_0 - R)/R_0\%]$ , qui représente la variation en pourcentage dans le  $R_t$  avant  $R_0$  et après la liaison à la DXN à divers temps ( $R_t$ ), a été utilisée pour évaluer la réponse de l'aptacapteur (figure 4.10). Ces dernières augmentent progressivement entre 10 et 100 minutes, suivie par un plateau et un changement non significatif entre 120 à 240 minutes indiquant la saturation et la liaison de tous les aptamères DEX 04 avec la DXN. Par conséquent, une durée de 120 min a été utilisée en tant que temps d'incubation optimal dans les expériences qui suivent.

#### 4.5 Étude de la spécificité de l'aptacapteur à la DXN

Pour des applications pratiques, il est nécessaire de tester la sélectivité et la spécificité de l'aptacapteur contre la DXN en présence d'autres interférences. Pour

ce faire, l'aptacapteur a été testé avec 20 mM de progestérone (P4), 17 $\beta$ -estradiol (E2) et de noréthistérone (NET) qui sont des hormones pouvant se présenter dans les mêmes échantillons environnementaux et ont une structure chimique similaire à la DXN.

L'histogramme des réponses des capteurs de  $[(R_0 - R)/R_0\%]$  est représenté dans la figure 4.11. Les changements de la réponse d'impédance de l'aptamère sont approximativement les mêmes pour le tampon BB que pour les autres hormones (P4, NET et E2). Cependant, ces changements sont largement inférieur au signal de LOD.

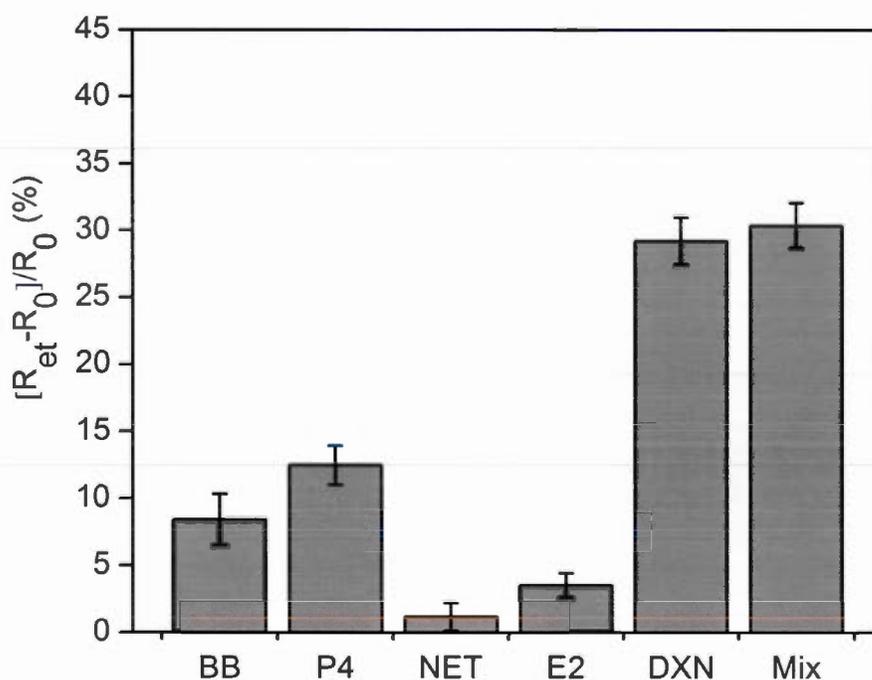


Figure 4.11: La réponse de l'aptacapteur  $\Delta R/R_0 \%$  contre le tampon BB, 20 nM de DXN, P4, NET, E2 et le mélange des DXN avec les composés interférents.

#### 4.6 Analyse des échantillons réels

Les performances de l'aptacapteur pour l'application de la DXN sur des échantillons réels ont été testées en préparant des concentrations de 0 nM, 50 nM et 100 nM de DXN dans l'eau du robinet de laboratoire, l'eau de fontaine potable et l'eau ultrapure. Les résultats sont résumés dans le tableau 4.3.

Tableau 4.3: Pourcentage de récupération de DXN dans des échantillons d'eau.

Échantillons	[DXN] (nM)	[Ret-R0]/R0 (%)	Récupération (%)	RSD (%)
Eau de robinet	0	$7,1 \pm 2,3$	-	2,26
	50	$46,0 \pm 2,5$	103,29	6,93
	100	$73,6 \pm 1,6$	90,68	2,19
Eau potable	0	$14,3 \pm 4,7$	-	4,67
	50	$38,3 \pm 2,3$	81,55	6,45
	100	$77,7 \pm 8,2$	96,19	11,57
Eau ultrapure	0	$10,6 \pm 2,4$	-	2,39
	50	$30,5 \pm 3,3$	88,03	8,13
	100	$76,5 \pm 3,6$	94,54	5,05

De bons pourcentages de récupération ont été obtenus dans l'échelle de 81,5 à 103,2% indiquant l'interférence non significative des composants de l'eau sur le mécanisme de détection de l'aptacapteur. Les écarts relatifs sont compris entre 2,2% et 11,5%. Une reprise acceptable selon une étude analytique dans les niveaux de ng/mL est de 40-120% et celle de RSD est de 30-45% (Taverniers *et al.*, 2004). Donc, on peut conclure que les recouvrements pour toutes les concentrations de DXN dans les échantillons étudiés sont acceptables. Finalement, ces résultats approuvent l'application réelle et l'utilisation de l'aptacapteur impédimétrique dans des analyses environnementales.

#### 4.7 Conclusion

À partir des résultats obtenus, nous avons atteint nos objectifs en termes d'affinité et spécificité qu'offre l'aptacapteur développé à la DXN. Un set de 10 aptamères a été isolé après 19 cycles de SELEX contre la DXN. Les aptamères sélectionnés ont été clonés et seulement six d'entre eux ont été séquencés et alignés afin de subir des tests de caractérisation. Seulement l'aptamère DEX 04 a montré une bonne affinité avec  $K_d = 18,35 \pm 4,5$  nM et une spécificité élevée à la DXN par rapport aux autres aptamères obtenues.

Par ailleurs, l'utilisation d'une plateforme électrochimique et plus précisément impédimétrique est également un avantage important, notamment en termes de seuil de détection et le temps de réponse le plus court. L'aptacapteur développé a une limite de détection de 0,85 ng/mL et offre aussi un bon rendement pour des applications environnementales.

## CHAPITRE V

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les progrès récents dans la nanobiotechnologie dont les biocapteurs et leur intégration dans divers disciplines, ont conduit au développement de nouvelles plateformes de détection avec des performances très améliorées. Le travail présenté dans ce mémoire représente un autre pas dans cette direction. Étant le principal objectif de notre mémoire, le développement d'une nouvelle et première plateforme électrochimique basée sur les aptamères comme éléments de biorecognition pour la dexaméthasone représente une alternative avantageuse en raison de sa haute sensibilité, sélectivité, et faible coût.

Dans le cadre de ce projet, nous avons réussi à sélectionner et caractériser le premier aptamère ayant une grande affinité et spécificité à la dexaméthasone, une substance largement utilisée de petit poids moléculaire (392,46 Da). Cet aptamère a démontré un changement significatif dans sa conformation avant et après la liaison à l'analyte comme démontré par la spectroscopie de dichroïsme circulaire. Comparativement aux autres méthodes de détection, l'aptacapteur proposé présente une limite de détection relativement basse de l'ordre de 0,85 ng/mL et un bon rendement de l'ordre de 81,5 à 103,2% tel que démontré par l'application réalisée sur différents échantillons d'eau.

Dans les perspectives de nos travaux, nous envisageons d'effectuer une recherche plus approfondie sur la structure de cet aptamère, et ce en étudiant les différentes séries de sa structure secondaire. Le but est de déterminer la partie essentielle pour la liaison avec la dexaméthasone et réduire ainsi la taille de la séquence à moins de nucléotides. Un autre axe de recherche possible est l'amélioration de la limite de détection de l'aptacapteur en utilisant des électrodes à base des matériaux ayant une conductivité élevée tels que le graphène ou le carbone afin d'augmenter la sensibilité de la plateforme. De même, nous comptons étudier la possibilité d'application de l'aptacapteur développé dans des échantillons cliniques comme application pour le diagnostic et le suivi médical. Par ailleurs, l'utilisation de cet aptacapteur pour le contrôle de la qualité des produits consommables d'origine animale tels que la viande et le lait est une piste importante d'application en raison de l'utilisation de la dexaméthasone dans le dopage des animaux. En terminant, il convient de noter que la plateforme développée est plus performante que l'offre commerciale actuelle en termes de sensibilité, coût et simplicité d'utilisation.

## RÉFÉRENCES

- Abdullah, J., Ahmad, M., Heng, L. Y., Karuppiah, N. et Sidek, H. (2007). An optical biosensor based on immobilization of laccase and mbth in stacked films for the detection of catechol. *Sensors*, 7(10), 2238–2250.
- Abelson, J. (1996). *Combinatorial chemistry*, volume 267. Elsevier.
- Armstrong, D. T. (1986). Environmental stress and ovarian function. *Biology of reproduction*, 34(1), 29–39.
- Barthelmebs, L., Hayat, A., Limiadi, A. W., Marty, J.-L. et Noguier, T. (2011). Electrochemical dna aptamer-based biosensor for ota detection, using superparamagnetic nanoparticles. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 156(2), 932–937.
- Bartlett, P. N. (2008). *Bioelectrochemistry : fundamentals, experimental techniques and applications*. John Wiley & Sons.
- Beiraghi, A., Pourghazi, K. et Amoli-Diva, M. (2014). Au nanoparticle grafted thiol modified magnetic nanoparticle solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for determination of steroid hormones in human plasma and urine. *Analytical Methods*, 6(5), 1418–1426.
- Benotti, M. J. et Snyder, S. A. (2009). Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds : implications for ground water replenishment with recycled water. *Ground water*, 47(4), 499–502.
- Binder, P. (1990). Immunocapteurs et biocapteurs non enzymatiques : principes et applications possibles en analyse. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 5(1), 23–33.

- Bishop, G. R., Ren, J., Polander, B. C., Jeanfreau, B. D., Trent, J. O. et Chaires, J. B. (2007). Energetic basis of molecular recognition in a dna aptamer. *Bio-physical chemistry*, 126(1), 165–175.
- Buck, R. P. et Lindner, E. (1994). Recommendations for nomenclature of ionselective electrodes (iupac recommendations 1994). *Pure and Applied Chemistry*, 66(12), 2527–2536.
- Capparelli, R., Iannelli, D. et Bordi, A. (1987). Use of monoclonal antibodies for radioimmunoassay of water buffalo milk progesterone. *Journal of Dairy Research*, 54(04), 471–477.
- Chang, I. S., Jang, J. K., Gil, G. C., Kim, M., Kim, H. J., Cho, B. W. et Kim, B. H. (2004). Continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell type biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(6), 607–613.
- Cherlet, M., De Baere, S. et De Backer, P. (2004). Quantitative determination of dexamethasone in bovine milk by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 805(1), 57–65.
- Chiappini, S. A., Kormes, D. J., Bonetto, M. C., Sacco, N. et Cortón, E. (2010). A new microbial biosensor for organic water pollution based on measurement of carbon dioxide production. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 148(1), 103–109.
- Citartan, M., Gopinath, S. C., Tominaga, J., Tan, S.-C. et Tang, T.-H. (2012). Assays for aptamer-based platforms. *Biosensors and Bioelectronics*, 34(1), 1–11.
- Contreras Jiménez, G., Eissa, S., Ng, A., Alhadrami, H., Zourob, M. et Siaj,

- M. (2015). Aptamer-based label-free impedimetric biosensor for detection of progesterone. *Analytical chemistry*, 87(2), 1075–1082.
- Cooper, D. E., D'Andrea, A., Faris, G. W., MacQueen, B., Wright, W. H. et Van Emon, J. (2007). Immunoassay and other bioanalytical techniques. *CRC, Boca Raton*.
- da Silva, B. F., Jelic, A., López-Serna, R., Mozeto, A. A., Petrovic, M. et Barceló, D. (2011). Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the ebro river basin, Spain. *Chemosphere*, 85(8), 1331–1339.
- Danielsson, B. et Flygare, L. (1990). Performance of a thermal biosensor in organic solvents. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 1(1-6), 523–527.
- Daughton, C. G. (2003). Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. i. rationale for and avenues toward a green pharmacy. *Environmental Health Perspectives*, 111(5), 757.
- Delvaux, M. et Demoustier-Champagne, S. (2003). Immobilisation of glucose oxidase within metallic nanotubes arrays for application to enzyme biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(7), 943–951.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T. et Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals : an endocrine society scientific statement. *Endocrine reviews*, 30(4), 293–342.
- Durie, B. (2006). Multiple myeloma patient handbook. 2006 ed. north hollywood. *Ca : International Myeloma Foundation*.

- Eggins, B. R. (2008). *Chemical sensors and biosensors*, volume 28. John Wiley & Sons.
- Eissa, S., Ng, A., Siaj, M., Tavares, A. C. et Zourob, M. (2013). Selection and identification of dna aptamers against okadaic acid for biosensing application. *Analytical chemistry*, *85*(24), 11794–11801.
- Ellington, A. D. et Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of rna molecules that bind specific ligands. *nature*, *346*(6287), 818–822.
- Ferro, Y., Perullini, M., Jobbagy, M., Bilmes, S. A. et Durrieu, C. (2012). Development of a biosensor for environmental monitoring based on microalgae immobilized in silica hydrogels. *Sensors*, *12*(12), 16879–16891.
- Fischer, L. M., Tenje, M., Heiskanen, A. R., Masuda, N., Castillo, J., Bentien, A., Émneus, J., Jakobsen, M. H. et Boisen, A. (2009). Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. *Microelectronic engineering*, *86*(4), 1282–1285.
- Fonda, E. S., RAMPACEK, G. B. et KRAELING, R. R. (1984). The effect of adrenocorticotropin or hydrocortisone on serum luteinizing hormone concentrations after adrenalectomy and/or ovariectomy in the prepuberal gilt\*. *Endocrinology*, *114*(1), 268–273.
- Gammoudi, I., Tarbague, H., Othmane, A., Moynet, D., Rebière, D., Kalfat, R. et Dejous, C. (2010). Love-wave bacteria-based sensor for the detection of heavy metal toxicity in liquid medium. *Biosensors and Bioelectronics*, *26*(4), 1723–1726.
- Gopinath, S. C. (2010). Biosensing applications of surface plasmon resonance-based biacore technology. *Sensors and Actuators B : Chemical*, *150*(2), 722–733.

- Goyal, R. N., Chatterjee, S. et Rana, A. R. S. (2010). Effect of cetyltrimethyl ammonium bromide on electrochemical determination of dexamethasone. *Electroanalysis*, 22(20), 2330–2338.
- Goyal, R. N., Gupta, V. K. et Chatterjee, S. (2009). A sensitive voltammetric sensor for determination of synthetic corticosteroid triamcinolone, abused for doping. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(12), 3562–3568.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voeroes, J. et Reimhult, E. (2008). Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors*, 8(3), 1400–1458.
- Gros, M., Petrović, M. et Barceló, D. (2006). Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (lc–ms/ms) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*, 70(4), 678–690.
- Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S. et Barceló, D. (2012). Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1248, 104–121.
- Grujić, S., Vasiljević, T. et Laušević, M. (2009). Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography–ion trap–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(25), 4989–5000.
- Halsall, H. et Heineman, W. (1990). Electrochemical immunoassay : an ultra-sensitive method. *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry/IFCC*, 2(4), 179–187.

- Hassan, S., Rowell, E. et Jackson, L. (1997). Enzyme linked immunosorbent assay for dexamethasone in equine urine. *Pak. J. Med. Res*, 36, 75–78.
- Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment : a review of recent research data. *Toxicology letters*, 131(1), 5–17.
- Huetos, O., Ramos, M., de Pozuelo, M. M., Reuvers, T. B. et San Andrés, M. (1999). Determination of dexamethasone in feed by tlc and hplc. *Analyst*, 124(11), 1583–1587.
- Hummel, D., Löffler, D., Fink, G. et Ternes, T. A. (2006). Simultaneous determination of psychoactive drugs and their metabolites in aqueous matrices by liquid chromatography mass spectrometry. *Environmental science & technology*, 40(23), 7321–7328.
- Hutchinson, A. M. (1995). Evanescent wave biosensors. *Molecular biotechnology*, 3(1), 47–54.
- Jaffrezic-Renault, N. et Dzyadevych, S. V. (2008). Conductometric microbiosensors for environmental monitoring. *Sensors*, 8(4), 2569–2588.
- Jarrar, H. (2011). *Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles*. (Thèse de doctorat). ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DE CHIMIE DE MONTPELLIER.
- Jelic, A., Gros, M., Ginebreda, A., Cespedes-Sánchez, R., Ventura, F., Petrovic, M. et Barcelo, D. (2011). Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water research*, 45(3), 1165–1176.
- Jenkins, D. M. et Delwiche, M. J. (2003). Adaptation of a manometric biosensor to measure glucose and lactose. *Biosensors and Bioelectronics*, 18(1), 101–107.

- Jo, M., Ahn, J.-Y., Lee, J., Lee, S., Hong, S. W., Yoo, J.-W., Kang, J., Dua, P., Lee, D.-k., Hong, S. *et al.* (2011). Development of single-stranded dna aptamers for specific bisphenol a detection. *Oligonucleotides*, *21*(2), 85–91.
- Karyakin, A. A., Bobrova, O. A., Lukachova, L. V. et Karyakina, E. E. (1996). Potentiometric biosensors based on polyaniline semiconductor films. *Sensors and Actuators B : Chemical*, *33*(1), 34–38.
- Kawazoe, N., Ito, Y., Shirakawa, M. et Imanishi, Y. (1998). In vitro selection of a dna aptamer binding to thyroxine. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, *71*(7), 1699–1703.
- Kim, Y. S., Jung, H. S., Matsuura, T., Lee, H. Y., Kawai, T. et Gu, M. B. (2007). Electrochemical detection of 17 $\beta$ -estradiol using dna aptamer immobilized gold electrode chip. *Biosensors and Bioelectronics*, *22*(11), 2525–2531.
- Kissinger, P. et Heineman, W. R. (1996). *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, revised and expanded*. CRC press.
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B. et Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in us streams, 1999-2000 : A national reconnaissance. *Environmental science & technology*, *36*(6), 1202–1211.
- LaLone, C. A., Villeneuve, D. L., Olmstead, A. W., Medlock, E. K., Kahl, M. D., Jensen, K. M., Durhan, E. J., Makynen, E. A., Blanksma, C. A., Cavallin, J. E. *et al.* (2012). Effects of a glucocorticoid receptor agonist, dexamethasone, on fathead minnow reproduction, growth, and development. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *31*(3), 611–622.
- Lee, J. H., Yigit, M. V., Mazumdar, D. et Lu, Y. (2010). Molecular diagnostic

- and drug delivery agents based on aptamer-nanomaterial conjugates. *Advanced drug delivery reviews*, 62(6), 592–605.
- Li, C., Wu, Y., Yang, T. et Zhang, Y. (2010). Rapid simultaneous determination of dexamethasone and betamethasone in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry with isotope dilution. *Journal of Chromatography A*, 1217(3), 411–414.
- Li, P.-h. S. (1993). Actions of corticotropin-releasing factor or cortisol on follicle-stimulating hormone secretion by isolated pig pituitary cells. *Life sciences*, 53(2), 141–151.
- Lin, Z., Chen, L., Zhang, G., Liu, Q., Qiu, B., Cai, Z. et Chen, G. (2012). Label-free aptamer-based electrochemical impedance biosensor for  $17\beta$ -estradiol. *Analyst*, 137(4), 819–822.
- Liss, M., Petersen, B., Wolf, H. et Prohaska, E. (2002). An aptamer-based quartz crystal protein biosensor. *Analytical Chemistry*, 74(17), 4488–4495.
- Lopez, C. A., Daaboul, G. G., Vedula, R. S., Özkumur, E., Bergstein, D. A., Geisbert, T. W., Fawcett, H. E., Goldberg, B. B., Connor, J. H. et Ünlü, M. S. (2011). Label-free multiplexed virus detection using spectral reflectance imaging. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(8), 3432–3437.
- López-Serna, R., Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., Petrović, M. et Barceló, D. (2013). Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of barcelona, spain. *Environmental Pollution*, 174, 305–315.
- López-Serna, R., Pérez, S., Ginebreda, A., Petrović, M. et Barceló, D. (2010). Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste

- waters by online solid phase extraction–liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Talanta*, *83*(2), 410–424.
- López-Serna, R., Petrović, M. et Barceló, D. (2012). Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the ebro river basin (ne spain). *Science of the total environment*, *440*, 280–289.
- Lorenz, W. et Schulze, K. (1975). Application of transform-impedance spectrometry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *65*(1), 141–153.
- Lowe, C. R. (1984). Biosensors. *Trends in biotechnology*, *2*(3), 59–65.
- Luppa, P. B., Sokoll, L. J. et Chan, D. W. (2001). Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, *314*(1), 1–26.
- Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L. et Lukyanov, S. A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent anthozoa species. *Nature biotechnology*, *17*(10), 969–973.
- Meyer, C., Hahn, U. et Rentmeister, A. (2011). Cell-specific aptamers as emerging therapeutics. *Journal of nucleic acids*, *2011*.
- Middaugh, C. R., Evans, R. K., Montgomery, D. L. et Casimiro, D. R. (1998). Analysis of plasmid dna from a pharmaceutical perspective. *Journal of pharmaceutical sciences*, *87*(2), 130–146.
- Mompelat, S., Le Bot, B. et Thomas, O. (2009). Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment international*, *35*(5), 803–814.
- Pérez, S. et Barceló, D. (2007). Application of advanced ms techniques to analysis

- and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(6), 494–514.
- Perry, M. (1998). Revised Australian code of practice for the care and use of animals for scientific purposes. *Australian veterinary journal*, 76(4), 286–286.
- Petersen, M., Bondensgaard, K., Wengel, J. et Jacobsen, J. P. (2002). Locked nucleic acid (lna) recognition of rna : Nmr solution structures of lna : Rna hybrids. *Journal of the American Chemical Society*, 124(21), 5974–5982.
- Clark Jr, L. (1956). Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *ASAIO Journal*, 2(1), 41–48.
- Radi, A.-E. et O'Sullivan, C. K. (2006). Aptamer conformational switch as sensitive electrochemical biosensor for potassium ion recognition. *Chemical communications*, (32), 3432–3434.
- Ramanathan, K. et Danielsson, B. (2001). Principles and applications of thermal biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(6), 417–423.
- Ramanathan, K., Jönsson, B. R. et Danielsson, B. (2001). Sol-gel based thermal biosensor for glucose. *Analytica Chimica Acta*, 427(1), 1–10.
- Reig, M., Mora, L., Navarro, J. L. et Toldrá, F. (2006). A chromatography method for the screening and confirmatory detection of dexamethasone. *Meat science*, 74(4), 676–680.
- Rosen, H., JAMEEL, M. L. et BARKAN, A. L. (1988). Dexamethasone suppresses gonadotropin-releasing hormone (gnrh) secretion and has direct pituitary effects in male rats : Differential regulation of gnrh receptor and gonadotropin responses to gnrh\*. *Endocrinology*, 122(6), 2873–2880.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. *et al.* (1989). *Molecular cloning*, volume 2. Cold spring harbor laboratory press New York.
- Sassolas, A., Blum, L. J. et Leca-Bouvier, B. D. (2011). Optical detection systems using immobilized aptamers. *Biosensors and Bioelectronics*, *26*(9), 3725–3736.
- Shrivastav, T. G., Chaube, S. K., Charu, Rangari, K., Kariya, K. P., Singh, R. et Nagendra, A. (2010). Enzyme linked immunosorbent assay for milk progesterone. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, *31*(4), 301–313.
- Simossis, V., Kleinjung, J. et Heringa, J. (2005). Homology-extended sequence alignment. *Nucleic acids research*, *33*(3), 816–824.
- Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C. et Zhao, J. (2008). Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *27*(2), 108–117.
- Stolker, A. A., Niesing, W., Hogendoorn, E. A., Versteegh, J. F., Fuchs, R., Udo, A. T. *et al.* (2004). Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *378*(4), 955–963.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C. et Strehlitz, B. (2005). Flumag-selex as an advantageous method for dna aptamer selection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *383*(1), 83–91.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C. et Strehlitz, B. (2007). Selex—a (r) evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular engineering*, *24*(4), 381–403.
- Suni, I. I. (2008). Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *27*(7), 604–611.

- Tam, P. D., Tuan, M. A., Huy, T. Q., Le, A.-T. et Van Hieu, N. (2010). Facile preparation of a dna sensor for rapid herpes virus detection. *Materials Science and Engineering : C*, 30(8), 1145–1150.
- Taverniers, I., De Loose, M. et Van Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. ii. analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 535–552.
- Tölgyesi, Á., Verebey, Z., Sharma, V. K., Kovacsics, L. et Fekete, J. (2010). Simultaneous determination of corticosteroids, androgens, and progesterone in river water by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 78(8), 972–979.
- Tombelli, S., Minunni, M., Luzi, E. et Mascini, M. (2005). Aptamer-based biosensors for the detection of hiv-1 tat protein. *Bioelectrochemistry*, 67(2), 135–141.
- Tsai, H.-H., Lin, C.-F., Juang, Y.-Z., Wang, I.-L., Lin, Y.-C., Wang, R.-L. et Lin, H.-Y. (2010). Multiple type biosensors fabricated using the cmos biomems platform. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 144(2), 407–412.
- Tuerk, C., Gold, L. et al. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment : Rna ligands to bacteriophage t4 dna polymerase. *Science*, 249(4968), 505–510.
- Updike, S. et Hicks, G. (1967). The enzyme electrode. *Nature*, 214, 986–988.
- Van der Linden, S. C., Heringa, M. B., Man, H.-Y., Sonneveld, E., Puijker, L. M., Brouwer, A. et Van der Burg, B. (2008). Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor calux bioassays. *Environmental science & technology*, 42(15), 5814–5820.

- Wang, X., Yan, T., Li, Y., Liu, Y., Du, B., Ma, H. et Wei, Q. (2015). A competitive photoelectrochemical immunosensor based on a cds-induced signal amplification strategy for the ultrasensitive detection of dexamethasone. *Scientific reports*, 5.
- Weaver, J. C., Cooney, C. L., Fulton, S. P., Schuler, P. et Tannenbaum, S. R. (1976). Experiments and calculations concerning a thermal enzyme probe. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 452(2), 285–291.
- Williams, K. P., Liu, X.-H., Schumacher, T. N., Lin, H. Y., Ausiello, D. A., Kim, P. S. et Bartel, D. P. (1997). Bioactive and nuclease-resistant l-dna ligand of vasopressin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(21), 11285–11290.
- Wood, R. (1902). Xlii. on a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 4(21), 396–402.
- Wu, F. et Lv, J. (2007). Flow injection chemiluminescence detection and solvent extraction for human skin ointment dexamethasone acetate absorption analysis and the reaction mechanism study. *Talanta*, 72(5), 1811–1817.
- Xue, F., Wu, J., Chu, H., Mei, Z., Ye, Y., Liu, J., Zhang, R., Peng, C., Zheng, L. et Chen, W. (2013). Electrochemical aptasensor for the determination of bisphenol a in drinking water. *Microchimica Acta*, 180(1-2), 109–115.
- Yang, X., Li, X., Si, D., Yang, Z., He, Z., Zhang, N., Zhang, S. et Shi, Z. (2016). [effect of dexamethasone contamination in drinking water on intestinal flora in mice]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*, 36(2), 238–243.
- Yildirim, N., Long, F., Gao, C., He, M., Shi, H.-C. et Gu, A. Z. (2012). Aptamer-

based optical biosensor for rapid and sensitive detection of  $17\beta$ -estradiol in water samples. *Environmental science & technology*, 46(6), 3288–3294.

Zayats, M., Huang, Y., Gill, R., Ma, C.-a. et Willner, I. (2006). Label-free and reagentless aptamer-based sensors for small molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 128(42), 13666–13667.

Zhang, Y., Wang, L., Sun, Y., Zhu, Y., Zhong, Z., Shi, J., Fan, C. et Huang, Q. (2013). Conjugation of dexamethasone to c60 for the design of an anti-inflammatory nanomedicine with reduced cellular apoptosis. *ACS applied materials & interfaces*, 5(11), 5291–5297.

Zheng, Y., Wang, Y. et Yang, X. (2011). Aptamer-based colorimetric biosensing of dopamine using unmodified gold nanoparticles. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 156(1), 95–99.

Zhu, B., Alsager, O. A., Kumar, S., Hodgkiss, J. M. et Travas-Sejdic, J. (2015). Label-free electrochemical aptasensor for femtomolar detection of  $17\beta$ -estradiol. *Biosensors and Bioelectronics*, 70, 398–403.