

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La recherche Scientifique*



**Université Constantine 1**

**&**

**Université Perpignan France**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

*Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire*

N° série :.....

N° ordre :.....

**THÈSE EN COTUTELLE**

Pour obtenir le grade de **DOCTEUR 3<sup>ème</sup> Cycle LMD**

*En BIOCHIMIE*

*Spécialité : Biochimie, Biotechnologies et Environnement*

Par

**RHOUATI Amina**

**Développement de méthodes bioanalytiques à base d'aptamères  
pour la détermination de l'ochratoxine A**

Soutenue :.....devant la commission d'examen :

Président de Jury : **BOUSSEBOUA H.**

Professeur à L'Université Constantine1, Algérie

Directeurs : **MERAIHI Z**

Professeur à L'Université Constantine1, Algérie.

Co- directeur : **MARTY J.L.**

Professeur. Université de Perpignan, France

Examineurs : **GHOMMIDH C.**

Professeur. Polytechnique Montpellier, France

**HARZALLAH D.**

Professeur à L'Université Ferhat A. Sétif, Algérie

**PFOHI LESZKOWICZ A.**

Professeur, ENSAT Toulouse, France

*Année Universitaire 2012/2013*

# Préface

Cette thèse a été réalisée en cotutelle entre l'Institut de Modélisation et d'Analyse en Géo-Environnement et Santé (IMAGES, EA4218), groupe biocapteurs de l'Université de Perpignan *Via Domitia*, France, et le laboratoire de génie microbiologique et applications à l'Université de Constantine 1, Algérie, sous la direction des professeurs : Jean-Louis MARTY et Zahia MERAIHI. La mobilité a été financée par le programme d'échange AVERROES.

Les travaux réalisés ont été valorisés par la publication de :

- **Articles:**

1. «Development of an oligosorbent for detection of Ochratoxin A». **A. Rhouati**, N. Paniel, Z. Meraihi and J-L. Marty. *Food Control*, Volume 22, Issue 11, November 2011, Pages 1790-1796.
2. «Recent advances in ochratoxin A-producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices». A.Hayat, N.Paniel, **A.Rhouati**, J-L.Marty, L.Barthelmebs. *Food Control*, [Volume 26, Issue 2](#), August 2012, Pages 401–415.
3. «Development of an automated flow-based electrochemical aptasensor for on-line detection of OTA». **A.Rhouati**, A.Hayat, D.B. Hernandez, Z. Meraihi, R. Munoz and J-L. Marty. *Sensors and Actuators B*, Volume 176 (2013) 1160–1166.

- **Communications orales:**

1. «A novel rapid and simple electrochemical aptasensor coupled to an automated flow system for ochratoxin A detection». **A.Rhouati**, A.Hayat, D.B. Hernandez, Z. Meraihi, R. Munoz and J.L. Marty. International conference on analytical and nanoanalytical methods for biomedical and environmental sciences, Brasov-Romania (Mai 2012).
2. «Développement de méthodes bio-analytiques à base d'aptamères pour la détection et la quantification de l'ochratoxine A dans les denrées alimentaires». **A. Rhouati**, Z. Meraihi and J.L. Marty. Congrès pluridisciplinaire des doctorants de l'UPVD, Perpignan-France (Juin 2012)

3. «Development of a fully automated flow aptasensor for ochratoxin A detection in foodstuffs». **A. Rhouati**, D.B. Hernandez, A. Hayat, R. Munoz, Z. Meraihi and J.L. Marty. 8<sup>ème</sup> workshop Franco-Chinois “Surface electrochemistry molecules of biological interest and biosensor applications”, Lacanau-Océan-France (Septembre 2012).
4. «Les aptamères: un nouvel outil pour la détection de l'ochratoxine». A. Hayat, **A. Rhouati**, C. Yang, J-L Marty. Biotrace, Montpellier, (Février 2012).
5. «Biosensors: an opportunity for the future?». A. Hayat, **A. Rhouati**, C. Yang, J-L Marty. International Conference of Viticulture and Oenology (SIMEI-ENOVITIS) Milan, Italie, (Novembre 2011).

- **Communications par affiche:**

1. «Extraction de l'Ochratoxine A d'échantillons alimentaires à l'aide d'un oligoadsorbant et quantification par HPLC-FD». **A. Rhouati**, N. Paniel, Z. Meraihi, J-L. Marty. Journée de la mycotoxine, Toulouse-France (Janvier 2011).
2. «Oligoadsorbant *versus* Immunoabsorbant pour l'extraction de l'Ochratoxine A». **A. Rhouati**, N. Paniel, Z. Meraihi et J-L. Marty. 9<sup>ème</sup> Congrès francophone des techniques séparatives et couplages, Toulouse –France (Mars 2011).
3. «Development of a new aptamer-based support for determination of Ochratoxin A and Ochratoxin hydroquinone in beer». **A.Rhouati**, N.Paniel, Z.Meraihi et J-L.Marty. Rencontres transfrontalières «capteurs et biocapteurs». Toulouse-France (Septembre 2011).
4. «Aptamers as promising bio-recognition elements in extraction and detection of Ochratoxin A». **A. Rhouati**, A. Hayat, N. Paniel, Z. Meraihi and J.L. Marty. 17<sup>th</sup> edition of transfrontier meeting of sensors and biosensors, Tarragona, Espagne (Septembre 2012).

# Remerciements

*Je tiens à remercier, pour la présente occasion, le programme d'échange AVERROES de m'avoir octroyé une bourse de mobilité pour me permettre de mener à bien mes études doctorales.*

*Je remercie également mon directeur de thèse en France, Pr, Jean-Louis Marty, pour m'avoir accueillis au sein de son équipe de recherche et de m'avoir permis de travailler sous sa direction durant toutes ces années de thèse. Merci pour votre aide, disponibilité ainsi que vos précieux conseils qui m'ont été très utiles.*

*Je tiens à remercier aussi ma directrice de thèse en Algérie, Pr. Zahia Meraihi, pour la qualité de l'enseignement qu'elle a su me donner et pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse.*

*Je remercie Pr Hacene Boussaboua d'avoir accepté de présider mon jury de thèse ainsi que Pr Charles Gommidt qui a bien voulu faire partie de mon jury de thèse. Je tiens également à remercier Pr Annie Pfohl-Leszkowicz et Pr Daoud Harzallah qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse*

*J'adresse également mes remerciements à tout le personnel et mes collègues du laboratoire IMAGES.*

*Je réserve aussi un remerciement très chaleureux à ma famille et particulièrement mes parents qui ont inspiré et soutenu mon intérêt scientifique, car jamais remettre en question mes choix de carrière et la liberté qu'ils m'ont donné tout au long de ma vie.*

# Sommaire

Liste des abréviations.....	1
Introduction générale.....	5

## Chapitre 1: Revue Bibliographique

<b>I. L'ochratoxine A: molécule cible étudiée.....</b>	<b>9</b>
<b>I.1 Les mycotoxines.....</b>	<b>9</b>
I.1.1 Nature des mycotoxines .....	9
I.1.2 Conditions de mycotoxinogenèse.....	9
I.1.3 Contamination et impacts sanitaires.....	10
<b>I.2 L'ochratoxine A (OTA) .....</b>	<b>10</b>
I.2.1 Origine et structure chimique .....	10
I.2.2 Propriétés physico-chimiques .....	11
I.2.3 Contamination alimentaire .....	11
I.2.4 Toxicité.....	12
I.2.5 Régulation et législation.....	13
I.2.6 Méthodes analytiques .....	13
<b>I.3 L'Ochratoxine B (OTB) et l'ochratoxine hydroquinone (OTHQ) .....</b>	<b>17</b>
I.3.1 Les métabolites de l'OTA .....	17
I.3.2 L'ochratoxine B (OTB).....	17
I.3.3 L'ochratoxine hydroquinone (OTHQ) .....	18
<b>II. Les aptamères : bio-éléments de reconnaissance utilisés .....</b>	<b>19</b>
<b>II.1 La technologie du SELEX .....</b>	<b>19</b>

II.1.1	Principe général du SELEX .....	20
II.1.2	Molécules cibles .....	21
II.1.3	La complexité de la librairie d'oligonucléotides .....	22
II.1.4	La sélection .....	22
II.1.5	L'amplification.....	24
II.1.6	Séparation des brins de l'ADN issu de l'amplification.....	25
II.1.7	Clonage et séquençage .....	25
II.1.8	Avantages et limitations du SELEX.....	26
<b>II.2</b>	<b>Propriétés des aptamères.....</b>	<b>26</b>
II.2.1	La taille.....	26
II.2.2	L'affinité.....	27
II.2.3	La spécificité .....	28
II.2.4	La structure des aptamères .....	29
II.2.5	Le complexe aptamère-cible .....	32
<b>II.3</b>	<b>Applications des aptamères.....</b>	<b>34</b>
II.3.1	Applications thérapeutiques .....	34
II.3.2	Applications analytiques .....	35
<b>III.</b>	<b>Méthodes d'extraction et de purification de l'OTA .....</b>	<b>36</b>
<b>III.1</b>	<b>L'extraction sur phase solide (SPE) .....</b>	<b>36</b>
III.1.1	Principe.....	36
III.1.2	Méthode conventionnelle de l'extraction sur phase solide .....	37
III.1.3	Paramètres de l'extraction sur phase solide .....	38
III.1.4	Mode de couplage .....	38

III.1.5	Présentation des supports conventionnels .....	40
<b>III.2</b>	<b>Les supports biologiques à reconnaissance moléculaire.....</b>	<b>42</b>
III.2.1	Les colonnes d'immunoaffinité ou immunoadsorbants .....	42
III.2.2	Les polymères à empreintes moléculaires (MIPs) .....	47
III.2.3	Les oligoadsorbants.....	49
<b>IV.</b>	<b>Méthodes biochimiques pour l'analyse de l'OTA dans les aliments .....</b>	<b>50</b>
<b>IV.1</b>	<b>Les méthodes d'immobilisation des biomolécules.....</b>	<b>51</b>
<b>IV.2</b>	<b>Les différents modes de transduction.....</b>	<b>52</b>
<b>IV.3</b>	<b>Les méthodes immunochimiques .....</b>	<b>54</b>
IV.3.1	Principe.....	54
IV.3.2	Les différents formats utilisés .....	55
IV.3.3	Les différents immunocapteurs rapportés dans la littérature pour la détermination de l'OTA.....	58
<b>IV.4</b>	<b>Les méthodes biochimiques basées sur les aptamères .....</b>	<b>60</b>
IV.4.1	Principe.....	60
IV.4.2	Les différents formats utilisés .....	61
IV.4.3	Les différents aptacapteurs développés pour la détermination de l'OTA.....	63
<b>V.</b>	<b>Objectifs de la thèse .....</b>	<b>65</b>
<b>Chapitre 2: Développement d'oligoadsorbants pour l'extraction et la quantification de l'ochratoxine A</b>		
<b>Introduction.....</b>		<b>71</b>
<b>I.</b>	<b>Synthèse des oligoadsorbants.....</b>	<b>68</b>
<b>I.1</b>	<b>Présentation des aptamères anti-OTA utilisés .....</b>	<b>68</b>

I.1.1	L'aptamère 1.12.2 .....	68
I.1.2	L'aptamère H12.....	69
<b>I.2</b>	<b>Présentation des supports d'immobilisation utilisés.....</b>	<b>70</b>
I.2.1	Le gel d'agarose activée par la streptavidine .....	70
I.2.2	Le gel de silice activée par la glutaraldéhyde.....	71
I.2.3	Le gel de sépharose activé par le bromure de cyanogène .....	71
<b>I.3</b>	<b>Protocole de synthèse des oligoadsorbants .....</b>	<b>72</b>
I.3.1	Réactifs.....	72
I.3.2	Méthode.....	74
<b>II.</b>	<b>Procédure d'extraction (Oligoextraction) .....</b>	<b>75</b>
<b>III.</b>	<b>Détermination par CLHP-FD et étalonnage .....</b>	<b>76</b>
<b>IV.</b>	<b>Application sur des échantillons réels : Bière .....</b>	<b>77</b>
<b>IV.1</b>	<b>Prétraitement de l'échantillon .....</b>	<b>78</b>
<b>IV.2</b>	<b>Immunoextraction de l'OTA de la bière par des colonnes d'immunoaffinité commerciales .....</b>	<b>79</b>
<b>IV.3</b>	<b>Oligoextraction de l'OTA de la bière .....</b>	<b>80</b>
<b>V.</b>	<b>Résultats et discussion .....</b>	<b>80</b>
<b>V.1</b>	<b>Performance des oligoadsorbants.....</b>	<b>80</b>
V.1.1	Oligoadsorbant à base de l'aptamère H12.....	80
V.1.2	Oligoadsorbant à base de l'aptamère 1.12.2 .....	83
<b>V.2</b>	<b>Réutilisabilité des oligoadsorbants .....</b>	<b>86</b>
<b>V.3</b>	<b>Oligoextraction de l'OTB .....</b>	<b>87</b>
<b>V.4</b>	<b>Oligoadsorbants <i>versus</i> colonnes d'immunoaffinité .....</b>	<b>88</b>



<b>Introduction.....</b>	<b>93</b>
--------------------------	-----------

### **Chapitre 3: Développement d'un aptacapteur couplé à un système à flux pour la détection de l'ochratoxine A**

<b>Introduction.....</b>	<b>97</b>
--------------------------	-----------

<b>I. Présentation des électrodes utilisées.....</b>	<b>92</b>
--	-----------

<b>II. Synthèse des conjugués.....</b>	<b>93</b>
--	-----------

<b>II.1 Réactifs.....</b>	<b>93</b>
---------------------------	-----------

<b>II.2 Biotinylation de l'OTA .....</b>	<b>94</b>
--	-----------

<b>II.3 Modification des billes magnétiques carboxyles avec l'aptamère amino-modifié</b>	<b>95</b>
--	-----------

<b>II.4 Modification des billes magnétiques aminées avec l'OTA .....</b>	<b>95</b>
--	-----------

<b>III. Présentation du système automatisé à flux.....</b>	<b>96</b>
--	-----------

<b>IV. Les formats utilisés .....</b>	<b>97</b>
---------------------------------------	-----------

<b>IV.1 Aptacapteur compétitif direct en flux .....</b>	<b>97</b>
---	-----------

<b>IV.2 Aptacapteur compétitif indirect en flux.....</b>	<b>98</b>
--	-----------

<b>V. Détection ampérométrique de l'OTA .....</b>	<b>98</b>
---	-----------

<b>VI. Préparation des échantillons réels: la bière .....</b>	<b>99</b>
---	-----------

<b>VII. Résultats et discussion .....</b>	<b>99</b>
---	-----------

<b>VII.1 Optimisation des paramètres du système à flux.....</b>	<b>99</b>
---	-----------

<b>VII.2 Aptacapteur compétitif direct.....</b>	<b>101</b>
---	------------

<b>VII.2.1 Optimisation de la procédure de l'essai compétitif direct.....</b>	<b>101</b>
---	------------

<b>VII.2.2 Performance de l'aptacapteur direct dans le tampon .....</b>	<b>106</b>
---	------------

<b>VII.3 Aptacapteur compétitif indirect.....</b>	<b>108</b>
---	------------

VII.3.1	Optimisation de la procédure de l'essai compétitif indirect.....	108
VII.3.2	Performance de l'aptacapteur indirect dans le tampon .....	111
VII.4	<b>Reproductibilité et spécificité de l'aptacapteur.....</b>	<b>113</b>
VII.5	<b>Effets de la matrice et applicabilité de l'aptacapteur en flux dans la bière</b>	<b>114</b>
VII.6	<b>Comparaison de l'aptacapteur développé avec les aptacapteurs décrits dans la littérature pour la détection de l'OTA.....</b>	<b>115</b>
VII.7	<b>Avantages du système automatisé à flux.....</b>	<b>116</b>
<b>Conclusion.....</b>		<b>121</b>

## **Chapitre 4: Sélection d'un aptamère spécifique de l'ochratoxine B *in vitro* par SELEX**

<b>Introduction.....</b>		<b>125</b>
I.	<b>Librairies et amorces utilisés .....</b>	<b>119</b>
II.	<b>Immobilisation de la cible .....</b>	<b>120</b>
II.1	<b>Choix du support d'immobilisation.....</b>	<b>120</b>
II.2	<b>Synthèse des billes magnétiques-OTB.....</b>	<b>120</b>
II.3	<b>Vérification de la conjugaison par ELISA.....</b>	<b>121</b>
III.	<b>Contre sélection ou clearing.....</b>	<b>122</b>
IV.	<b>Sélection Hybridation avec l'OTB .....</b>	<b>122</b>
V.	<b>Amplification par PCR et révélation par électrophorèse .....</b>	<b>123</b>
V.1	<b>Réactifs .....</b>	<b>123</b>
V.2	<b>PCR .....</b>	<b>123</b>
VI.	<b>Optimisation du nombre de cycles PCR.....</b>	<b>125</b>
VII.	<b>Séparation des produits PCR doubles brins en ADN simple brin .....</b>	<b>127</b>

<b>Conclusion.....</b>	<b>135</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>137</b>
<b>Perspectives.....</b>	<b>143</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>145</b>
<b>Listes des tableaux.....</b>	<b>148</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>151</b>

## *Liste des abréviations*

1-NP: 1-naphtyl phosphate

A.O.C.A: Association Officielle des Chimistes Analytiques

ALISA: Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay

BB: Binding Buffer (Tampon de fixation)

BSA: Bovin Serum Albumin (Albumine sérique de boeuf)

CIA: Chemiluminescence Immuo-Assay (Immunoessai basé sur la chemiluminescence)

CLHP-FD: Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à une Détection de Fluorescence

DEA: Diéthanolamine

dNTP: DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates

DPBS: Dulbecco's phosphate buffered saline (Tampon phosphate salin de Dulbecco)

EC: Electrophorèse Capillaire

EDC: 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

EIA: Enzyme Immuno-Assay (Immunoessai enzymatique)

ELAA: Enzyme Linked Aptamer Assay

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ELONA: Enzyme Linked Oligonucleotide Assay

ELOSA: Enzyme Linked Oligosorbent Assay

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)

FIA: Fluorescence Immuno-Assay

FTIR-RTA: Spectroscopie infrarouge à transformée de fourier couplée à la réflectance totale atténuée

HRP: Horseradish Peroxidase (Peroxidase de raifort)

IACs: Immunoaffinity Columns (Colonnes d'immunoaffinité)

IARC: International Agency of Research on Cancer (Agence internationale de la recherche sur le cancer)

IES: Ionisation Electrospray (Ionisation par électronébuliseur)

KD: Constante de Dissociation

LOD: Limit Of Detection (Limite de detection)

MES: 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

MIP: Polymère à Empreintes Moléculaires

MWCT: Molecular Weight Cut-Off (Seuil de coupure moléculaire)

NEB: Néphropathie Endémique des Balkans

NHS: N-Hydroxysuccinimide

OIV: Organisation Internationale de la Vigne et du vin

OTA: Ochratoxine A

OTB: Ochratoxine B

OTHQ: Ochratoxine Hydroquinone

Ppb: Particule par Billion

QCM: Microbalance à Quartz

R%: Recovery percentage (Pourcentage de rendement)

R.E%: Relative Error (Erreur relative)

RIA: Radio Immuno-Assay

rpm: Rotation Par Minute

SELDI-MS: Surface Enhancement Lazer Desorption/ Ionization-Mass Spectrometry

SELEX: Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment

SM: Spectroscopie de Masse

SPCE: Screen Printed Carbon Electrode (Electrode de carbone sérigraphiée)

SPE: Solid Phase Extraction (Extraction sur phase solide)

SPME: Solid Phase MicroExtraction (Microextraction sur phase solide)

SPR: Résonance des Plasmons de Surface

TAR: Trans-activation response element (l'élément de réponse transcriptionnel)

TBE: Tris Borate EDTA

TE: Tris-EDTA

TS: Tampon de Sélection

TT: Tris Tween

VEGF: Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Vf: Volume de fin de Fixation

VIH: Virus d'Immunodéficience Humaine

## *Introduction générale*

Le nombre de maladies d'origine alimentaire ne cesse d'augmenter à travers le monde. La connaissance des sources potentielles de contamination des aliments est donc un élément indispensable pour une bonne nutrition. La contamination alimentaire peut être d'origine environnementale; plusieurs contaminants environnementaux peuvent entrer dans la chaîne alimentaire, tels que les pesticides, les métaux lourds et d'autres composés. Cependant, la contamination bactérienne est plus fréquente, les micro-organismes (bactéries, champignons, moisissures...) peuvent contaminer nos aliments en cours de production, de transformation et de transport. Certains microorganismes comme les moisissures peuvent être toxigènes car ils sont capables de synthétiser des métabolites toxiques, **les mycotoxines**.

Les mycotoxines sont des petites molécules peu solubles dans l'eau, difficilement dégradables par les organismes vivants et très stables que ce soit en milieu acide, basique ou à la chaleur. Elles contaminent de nombreuses denrées d'origine végétale, notamment les céréales et les fruits, les aliments transformés ou manufacturés comme le lait, le café, les œufs, les viandes ou les abats. La FAO (L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture) estime qu'au moins 25% des céréales produites chaque année dans le monde sont contaminées par des mycotoxines. Même à l'état de traces, les mycotoxines peuvent avoir des effets néfastes sur la santé humaine et animale.

Parmi les mycotoxines connues à ce jour, on s'intéresse dans ce travail aux ochratoxines qui sont principalement produites par les genres *Penicillium* et *Aspergillus* qui se développent sur un très grand nombre de produits alimentaires et selon les conditions de température, pH et humidité. La principale ochratoxine est **l'ochratoxine A**, qui est la plus abondante et la plus toxique du groupe des ochratoxines. L'OTA est une toxine néphrotoxique avec des effets cancérogènes importants chez les rongeurs. Elle possède également des effets cytotoxiques, cancérogènes, tératogènes et immunotoxiques chez l'homme.

La commission européenne a fixé des normes pour préserver la santé humaine. Les méthodes d'analyse ont connu, au cours des dernières années, de nombreux développements technologiques dans les domaines de la purification et de la détection. Comme l'OTA a une structure isocoumarinique liée à une L-phénylalanine, cette toxine possède des propriétés fluorescentes, ce qui permet sa détection par Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à une Détection par Fluorescence (CLHP-FD). L'analyse chromatographique est généralement précédée par une étape d'extraction de l'échantillon qui peut être réalisée par



SPE (Solid Phase Extraction) ou SPME (Solid Phase Micro Extraction), mais la méthode de référence, qui est la plus utilisée, est basée sur l'utilisation des colonnes d'affinité à base d'anticorps. Cette dernière est fondée sur la forte interaction anticorps-antigène ce qui induit un mécanisme de reconnaissance moléculaire. L'utilisation des colonnes d'immunoaffinité (IAC) permet la pré-concentration de l'analyte et permet ainsi d'augmenter la sensibilité de la méthode. Cependant, les anticorps restent très coûteux, difficiles à produire, et sont des molécules instables. De plus, les IACs sont des colonnes à usage unique et manquent parfois de spécificité. A cet effet, une approche alternative peut être envisagée par l'utilisation d'une nouvelle classe de molécules de reconnaissance, **les aptamères**.

Les aptamères sont des séquences oligonucléotidiques ADN ou ARN simple ou double brins, sélectionnés à partir d'une banque aléatoire selon leur aptitude à reconnaître une cible (petites molécules organiques ou inorganiques, peptides, protéines ou cellules) par une méthode combinatoire de sélection *in vitro* appelée SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment). Ces oligonucléotides possèdent une forte affinité et spécificité envers leur cible comparables à celle d'un complexe antigène-anticorps. Ils présentent cependant une meilleure stabilité et leur production est moins onéreuse et plus facile que celle des anticorps.

On vise donc dans cette thèse à exploiter les avantages de ces nouvelles molécules par rapport aux anticorps afin de développer de nouvelles méthodes à base d'aptamères pour l'extraction et la détection de l'OTA dans les denrées alimentaires.

La première partie de mes travaux de thèse se focalise sur **l'extraction de l'OTA par la mise au point de colonnes d'affinité à base d'aptamères ou oligoadsorbants avec une première application sur la bière**. Ce système consiste en une cartouche contenant un gel de sépharose sur lequel un aptamère spécifique de l'OTA est immobilisé par liaison covalente. En filtrant l'échantillon contaminé par l'OTA, cette dernière va se fixer sur le support. Les interférents sont par la suite éliminés par un simple lavage et l'OTA peut être décrochée à l'aide d'une solution de désorption. Enfin, la quantité de la toxine dans l'échantillon est mesurée par CLHP-FD. L'oligoextraction semble être une très bonne alternative à l'immunoextraction, les aptamères sont des petites molécules ce qui améliore la densité du greffage et la capacité du support. De plus, la possibilité de régénérer les aptamères en quelques minutes fait des oligoadsorbants des outils d'extraction recyclables.

La CLHP-FD était la méthode de détection utilisée afin de quantifier l'OTA après oligoextraction. Malgré son efficacité, cette méthode classique est laborieuse, nécessite du matériel de référence, du personnel qualifié et demande beaucoup de temps. Récemment, des méthodes de détection biochimique ont émergé et présentent une bonne alternative aux méthodes chromatographiques, car elles sont moins coûteuses, simples, et ne nécessitent pas de grand appareillage ni de personnel qualifié. Ce sont principalement des méthodes immunochimiques de type ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ou de type biocapteur. **Un biocapteur** est un système analytique associant un élément biologique sensible permettant la reconnaissance de la molécule recherchée et un transducteur physique qui convertit un signal biologique (l'évènement de reconnaissance) en un signal physique mesurable.

Après la sélection d'un aptamère spécifique de l'OTA, plusieurs biocapteurs électrochimiques à base d'aptamère (aptacapteur ou aptasensor) ont été rapportés. Cependant, tous les aptacapteurs décrits pour la détection de l'OTA ont été développés «en batch». Malgré leur sensibilité, ces méthodes impliquent un effort et un long temps d'analyse d'où l'importance d'automatiser les procédures en utilisant **un système de détection automatisé en flux**.

La deuxième partie de mon travail s'intéresse donc **au développement d'un aptacapteur électrochimique entièrement automatisé en flux pour la détection en ligne de l'OTA**. Deux formats ont été développés, un aptacapteur compétitif direct et un aptacapteur compétitif indirect. Les billes magnétiques ont été utilisées comme support d'immobilisation pour l'élément de reconnaissance et de la cible. Ces billes modifiées sont maintenues à l'aide d'un aimant sur des électrodes en carbone sérigraphiées placées dans une cellule de flux et connectée à un potentiostat. L'utilisation d'un système automatisé en flux offre plusieurs avantages à la méthode de détection en réduisant le temps d'analyse, en simplifiant les procédures d'optimisation et en améliorant la sensibilité.

La dernière partie du travail s'intéresse à une autre ochratoxine, l'ochratoxine B (OTB), l'analogue déchloré de l'OTA. Le travail a été basé sur **la sélection d'un aptamère spécifique de l'OTB *in vitro* par SELEX**. Une fois développé, cet aptamère sera utilisé pour transférer les techniques mises au point au cours de cette thèse pour l'extraction et la détection de l'OTB dans les denrées alimentaires.

*Chapitre 1*  
*Revue bibliographique*

# **I. L'ochratoxine A: molécule cible étudiée**

## **I.1 Les mycotoxines**

### **I.1.1 Nature des mycotoxines**

Une bio-toxine est une substance produite par les activités métaboliques d'une espèce végétale, animale ou par un micro-organisme, pouvant être nocif pour un autre organisme. Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques élaborés par les champignons, majoritairement par les moisissures saprophytes qui se développent sur une variété de denrées alimentaires y compris l'alimentation animale. Les mycotoxines peuvent être produites lors du développement de la plante en plein champ ou lors du stockage après la récolte. Plus de 400 mycotoxines produites par 200 espèces différentes ont été identifiées. Elles ont une composition chimique variable, ce qui fait que leurs propriétés physico-chimiques et toxicologiques sont extrêmement variées. Il s'agit de composés dérivés d'acides aminés comme la gliotoxine, de polycétides comme les ochratoxines et les aflatoxines et d'autres dérivés des terpènes comme les roridines [1].

### **I.1.2 Conditions de mycotoxinogénèse**

La production des mycotoxines est un processus complexe qui n'est pas entièrement connu. Le potentiel de mycotoxinogénèse dépend de plusieurs facteurs environnementaux tels que la température, la disponibilité en eau, le pH, la composition gazeuse et la composition en éléments nutritifs [2]. Le métabolisme secondaire des champignons est régulé par des mécanismes génétiques qui répondent à divers stimuli de l'environnement [2]. Cependant, le mode d'action de ces facteurs à l'échelle moléculaire durant la toxinogénèse n'est pas encore élucidé. Le même champignon peut produire une gamme très différente de mycotoxines sous différentes conditions [3, 4]. Les espèces fongiques varient considérablement dans leur capacité de produire des toxines, certains champignons ne possèdent pas les gènes responsables de la mycotoxinogénèse. D'autre part, en présence de ces gènes, les mycotoxines ne sont pas nécessairement synthétisées, celles-ci demandant des conditions particulières [5].

## I.1.3 Contamination et impacts sanitaires

Les principales denrées alimentaires contaminées par les mycotoxines sont les céréales (blé, orge, maïs, riz, seigle, avoine, orge), les oléagineux (arachide, soja, tournesol), les fruits (agrumes, bananes, pommes, raisins), les fruits secs, le café, le cacao, les épices, les haricots et les petits pois. Les mycotoxines peuvent être également présentes dans la bière et le vin produits à partir de céréales ou de raisins contaminés. Elles peuvent aussi entrer dans la chaîne alimentaire humaine par consommation de produits carnés, les œufs, le lait et le fromage [6].

La revue de la littérature scientifique sur les pathologies humaines liées aux mycotoxines a révélé une relation entre l'ingestion des mycotoxines et certaines maladies hépatiques, gastro-intestinales, cancérogènes, néphropathiques, tératogéniques et immunosuppressives [7, 8]. En se basant sur leurs effets néfastes sur la santé animale et humaine, les ochratoxines, les aflatoxines, les fumonisines et les trichothécènes sont considérés comme les mycotoxines les plus importantes en agriculture.

## I.2 L'ochratoxine A (OTA)

### I.2.1 Origine et structure chimique

L'ochratoxine A est l'une des mycotoxines les plus abondantes et dangereuses trouvées dans l'alimentation animale et humaine [9]. Elle a été découverte en 1965 par Van der Merwe *et al* [10] lors d'une recherche systématique de mycotoxines. L'OTA est produite par certaines souches de champignons filamenteux de type *Aspergillus* et *Penicillium* appartenant majoritairement aux deux sections *Circumdati* (le groupe *Aspergillus ochraceus*) et *Nigri* (*Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus nigri*) [11]. Il a été démontré récemment que deux nouvelles espèces, *A.westerdijkiae* et *A.steynii*, produisent l'OTA plus que *A.ochraceus* [12]. Ainsi, deux espèces de *Penicillium*, *P.nordicum* et *P.verrucosum* sont connues par leur potentiels ochratoxinogénique [13].

L'OTA est une mycotoxine, dérivée de la famille des dihydrocoumarines. Elle est formée par un groupement isocoumarine substitué (7-carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-méthylisocoumarine) lié à la L-β-phénylalanine par une liaison amide [14].

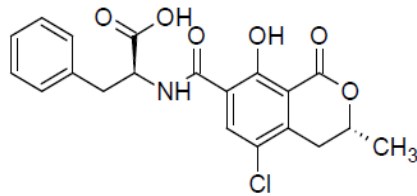


Figure 1: Structure chimique de l'OTA [15].

## I.2.2 Propriétés physico-chimiques

L'OTA est un composé incolore et cristallin de masse molaire 403,8 g/mole. L'OTA est soluble dans les solvants organiques polaires à pH acide ou neutre ainsi que dans les solutions aqueuses alcalines, mais elle est faiblement soluble dans l'eau. Cristallisée dans le xylène, l'OTA forme des cristaux qui émettent une fluorescence verte (milieu acide) bleue (milieu alcalin) en lumière UV; ces cristaux ont un point de fusion de 169°C. Le point de fusion de l'OTA diminue à 90°C lorsqu'elle est cristallisée dans le benzène. L'OTA est un acide organique faible ayant un pKa de 7,1, présentant deux groupements ionisables: le groupement carboxyle de la phénylalanine (pKa 4,4) et le groupement hydroxyle phénolique (pKa 7,3) [16]. L'OTA est instable à la lumière et à l'air, elle se dégrade même après une brève exposition à la lumière essentiellement dans des conditions humides. Cependant, elle est résistante à l'acidité et aux hautes températures. L'OTA peut résister à 3 heures d'autoclavage à 121°C [17].

## I.2.3 Contamination alimentaire

La présence de l'OTA dans les produits alimentaires est très répandue, essentiellement, dans les climats tempérés [18]. Les céréales (blé, maïs, seigle, avoine, orge...) et leur produits dérivés (bière, vodka, farine, pain, pâtes...) sont les principaux contributeurs à l'apport de l'OTA chez l'homme [19, 20], où 50% de la quantité d'OTA présente dans l'alimentation humaine quotidienne est issue des produits céréaliers [21].

Par ailleurs, le vin a été considéré récemment comme la deuxième source de consommation humaine d'OTA (10 à 15% de la consommation quotidienne) [22-24]. Plusieurs études récentes ont montré la présence de l'OTA dans les vins et les jus de raisin [25-27]. Cela a été expliqué par le fait que les raisins ont été contaminés dans le vignoble avant la véraison par différentes espèces ochratoxinogéniques, et que la production de l'OTA augmente rapidement pendant les stages de maturation [28].

On note également la présence de l'OTA dans le café [29, 30], le cacao [31], les fruits secs [32], les épices [33] et les herbes [34]. D'une autre part l'OTA est aussi présente dans les produits carnés, le lait et les produits laitiers [35].

Tableau 1: caractéristiques spectrales de l'OTA [28]

Spectres	Solvants	Caractéristiques
UV-VIS	EtOH	$\lambda_{\max}=213\text{nm}$ ( $\epsilon 36.800$ )
		$\lambda_{\max}=332\text{nm}$ ( $\epsilon 6.400$ )
Fluorescence	EtOH 96%	$\lambda_{\max}=467\text{nm}$
	EtOH/ABS	$\lambda_{\max}=428\text{nm}$
IR	$\text{CHCl}_3$	3380 ; [36]2988 ; 1723 ; 1674 ; 1528 ; 1425 ; 1381 ; 1304 ; 1260 ; 1170 ; 1140 ; 1107 ; 827 $\text{cm}^{-1}$
NMR $^1\text{H}$ 250-MHZ	$\text{CDCl}_3$	$\delta$ 12,70 ; $\delta$ 10,80 ; $\delta$ 8,55 ; (3H) ; $\delta$ 7,23 ; $\delta$ 7,15 ; (H Aromatique) ; $\delta$ 4,71 ; $\delta$ 5,07 ; (CH) ; $\delta$ 2,78 ; $\delta$ 3,2 (CH <sub>2</sub> ) ; $\delta$ 1,55 (CH <sub>3</sub> )
MS	-----	m/z 239/241
		m/z 255/257
		ion moléculaire m/z 403

## I.2.4 Toxicité

L'OTA est un contaminant alimentaire toxique pour l'homme et les animaux. Elle a été cataloguée néphrotoxique, cancérogène du groupe 2B (peut provoquer le cancer) (IARC, 1993), tératogène et immunosuppressive.

Des expériences réalisées sur des animaux ont montré les propriétés néphrotoxiques de l'OTA [37, 38]. Chez l'homme, elle est supposée être impliquée dans la néphropathie endémique des Balkans (NEB). Son effet initial se trouve dans le néphron, au niveau du tube contourné proximal où elle provoque un dysfonctionnement mitochondrial [39]. Des études ont montré l'augmentation de la fréquence des carcinomes du bassinet rénal, de l'uretère et de la vessie dans les mêmes régions où la NEB a été trouvée [40], ce qui a confirmé l'hypothèse que l'OTA est néphrotoxique et carcinogène [38].

Les effets immunologiques et hématopoïétiques de l'OTA ont été également démontrés [41] grâce à des expériences menées sur des souris, où une suppression de l'activité des cellules NK (Natural Killer) associée à une augmentation de la croissance des cellules tumorales transplantées a été observée [42]. Par ailleurs, Gilani *et al* [43] ont étudié l'effet tératogène de l'OTA sur des embryons de poulets. L'examen microscopique des embryons traités par OTA pendant 48 heures, a révélé des malformations des valves, des sténoses aortiques et des communications interventriculaires.

## **I.2.5 Régulation et législation**

Vu la contamination alimentaire par l'OTA ainsi que ses effets toxiques sur la santé humaine et animale, le comité scientifique de l'union européenne a établie une dose journalière tolérable hebdomadaire de 5ng d'OTA par kilo de poids corporel [44]. Par ailleurs, plusieurs directives de la commission européenne sont publiées, afin de fixer les teneurs maximales d'OTA permises dans les denrées alimentaires ()[45].

## **I.2.6 Méthodes analytiques**

L'OTA peut être facilement détectée dans les échantillons alimentaires en utilisant des méthodes analytiques efficaces et hautement sélectives. Comme l'OTA est dérivée d'un acide isocoumarinique liée à une L-phénylalanine, cette toxine possède une activité optique et des propriétés fluorescentes [46]. Pour cela, les techniques chromatographiques ont été généralement considérées comme méthodes de référence [6, 47]. Par ailleurs, différentes méthodes analytiques ont été décrites pour la détermination de l'OTA dans diverses matrices alimentaires.

### **I.2.6.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)**

La CCM était la méthode traditionnelle la plus utilisée pour une analyse quantitative ou semi-quantitative de l'OTA [48]. Cela est du à son faible coût et à l'identification facile des composés cibles en utilisant l'analyse spectrale UV-vis [6]. La séparation est effectuée en utilisant une phase stationnaire de silice et une phase mobile composée de différents solvants organiques (chloroforme, méthanol ou éthanol, toluène/acétate d'éthyle). La CCM la plus utilisée est celle décrite par Nesheim *et al* [6]. Il s'agit d'une extraction de l'échantillon avec un mélange chloroforme-eau (1:9, *v/v*), suivie par une chromatographie de l'extrait sur une



colonne diatomée de bicarbonate de sodium aqueux. Finalement, l'OTA est éluee et la CCM est réalisée.

Tableau 2: Teneurs maximales de l'OTA dans les denrées alimentaires [49, 50]

Produits	OTA: teneurs aximales (µg/kg ou ppb)	Directive
1 Céréales (y compris le riz et le sarrasin) et produits dérivés des céréales	5,0	2002/26/CE
1.1.Grains de céréales brutes (y compris le riz brut et le sarrasin)	3,0	
1.2.Tous les produits dérivés des céréales (y compris les produits de céréales transformés et les grains de céréales destinés à la consommation humaine directe)	10,0	
	5,0	2002/26/CE
2 Raisins secs (raisins de Corinthe, sultanines et autres raisins secs)	10,0	
3 Grains de café torréfié et café torréfié moulu à l'exception du café soluble	2,0	2002/26/CE
3.1 Café soluble (café instantané).		
4 Vin (rouge, blanc et rosé) et autres boissons à base de vin et/ou de moût de raisins		
5 Jus de raisin, ingrédients à base de jus de raisin dans d'autres boissons, y compris le nectar de raisin et le jus de raisin concentré reconstitué	2,0	2005/123/CE
5.1 Moût de raisins et moût de raisins concentré reconstitué, destinés à la consommation humaine directe	2,0	2005/123/CE
6 Préparations à base de céréales et aliments pour bébés destinés aux nourrissons et enfants en bas âge	0,5	2005/123/CE
		2005/123/CE
7 Aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales spécifiquement pour les nourrissons	0,5	
		2005/123/CE
		2004/683/EC
		2004/683/EC

Malgré ses avantages, la CCM a deux principaux inconvénients: la tache de la cible peut correspondre à une impureté co-extraite, et la quantité de la mycotoxine peut être incorrectement mesurée. Ces défauts peuvent être surmontés en utilisant la CCM bidimensionnelle. En outre, la CCM souffre aussi de faible résolution et sensibilité [47].

### **I.2.6.2 Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)**

De nos jours, la technique analytique la plus couramment utilisée pour la détermination de l'OTA est la CLHP couplée à une détection fluorimétrique (FD), grâce à la fluorescence naturelle de l'OTA. La CLHP est également appropriée à la détermination de l'OTA dans les matrices complexes (alimentation animale, café, sang et lait) après une étape de purification. La plupart des méthodes CLHP utilisent une colonne C18 à phase inverse et une phase mobile acide où le groupement carboxyle de l'OTA est dans sa forme non dissociée [47]. L'acidification de la phase mobile est indispensable sinon l'OTA est éluée avec le front de solvant. En général, la phase mobile est un mélange d'acétonitrile ou méthanol avec de l'acide acétique ou phosphorique dilué. L'acétonitrile est plus utilisé car le mélange acétonitrile-eau possède une plus faible viscosité et une meilleure efficacité de séparation que le mélange méthanol-eau [51].

La CLHP est largement utilisée grâce à sa sensibilité, on peut atteindre des limites de détection très faibles correspondant aux normes européennes en utilisant la CLHP-FD. Récemment, l'amélioration de l'efficacité des détecteurs de fluorescence a permis de détecter l'OTA à de très faibles concentrations. C'est pour cette raison que cette méthode est recommandée par l'A.O.C.A pour la détermination de l'OTA dans les céréales, le vin et la bière [52].

La CLHP couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM), à l'ionisation par électronébuliseur (CLHP-IES) et à la SM/SM bidimensionnelle était déjà utilisée dans la détermination de l'OTA avec des limites de détection comparables à celle de la CLHP-FD [53, 54]. Les principaux avantages de ces techniques sont l'automatisation du traitement de signal et la simplicité de la préparation des échantillons (possibilité d'analyser les extraits bruts) [55].

### **I.2.6.3 Chromatographie à paire d'ion**

Cette technique est basée sur la tendance de l'OTA à former une paire d'ion en présence d'un contre-ion (Par exemple, l'acétyle méthyle ammonium) dans la phase mobile constituée d'acétonitrile et de PBS. La CLHP à paire d'ion a été également utilisée dans la détermination de l'OTA dans le lait humain, de vache et du rat [56]. Le désavantage de cette

méthode est qu'un simple changement dans la composition de la phase mobile entraîne une variation dans la rétention de l'OTA [47].

#### **1.2.6.4 Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)**

La CPG est régulièrement utilisée dans la détermination des mycotoxines dans les matrices alimentaires, elle est généralement couplée à des techniques de détection (SM, détecteur à ionisation de flamme ou à la spectroscopie infrarouge à transformée de fourier) afin de détecter les produits volatils [6]. Comme toutes les mycotoxines, l'OTA n'est pas une molécule volatil et doit être transformée afin d'être analysée par CPG. Dans une étude réalisée par Jiao *et al* [57], l'OTA a été convertie à un dérivé O-méthyl ochratoxine A méthyl ester qui est facilement identifié par CPG-SM avec une limite de détection de 0,1µg/L.

Malgré sa précision et sa sensibilité, la CPG est rarement utilisée dans la détermination de l'OTA en raison de l'existence de la CLHP qui est une méthode moins coûteuse et plus rapide.

#### **1.2.6.5 Electrophorèse capillaire (EC)**

Dans ce cas, la séparation est basée sur la migration des composés selon la charge et la masse dans un champ électrique. Contrairement aux autres techniques utilisant des solvants organiques, les séparations rapides sont réalisées dans des solutions aqueuses. L'EC couplée à la fluorescence induite par le laser a été utilisée pour la détermination de l'OTA dans le café torréfié, dans le maïs et dans le sorgho. La sensibilité de la méthode était comparable à celle de la CLHP permettant une excellente séparation de l'OTA des interférences.

L'utilisation de faibles volumes d'échantillons, de capillaires versatiles et peu coûteux et l'absence de solvants organiques a fait de cette méthode une bonne alternative à la CLHP [58].

#### **1.2.6.6 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier couplée à la réflectance totale atténuée (FTIR-RTA)**

Galvis-Sanchez *et al* [59] ont utilisé la FTIR-RTA pour le dosage de l'OTA dans les raisins secs. La méthode était testée sur des échantillons enrichis à différentes concentrations d'OTA comprises entre 2 et 50µg/kg. Cette méthode comprend un prétraitement de

l'échantillon sur une cartouche C18. L'analyse du spectre des échantillons de raisins secs enrichis a montré une bonne corrélation entre les données spectrales et la concentration de référence pour l'OTA.

## **I.3 L'Ochratoxine B (OTB) et l'ochratoxine hydroquinone (OTHQ)**

### **I.3.1 Les métabolites de l'OTA**

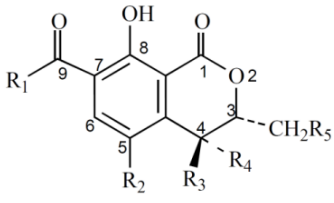
Le métabolisme d'une mycotoxine affecte considérablement sa toxicité chez l'homme, les animaux et les plantes. Chez l'homme et les animaux, l'OTA peut être métabolisée dans le rein, le foie et les intestins. L'hydrolyse, l'hydroxylation, l'ouverture de lactone et la conjugaison sont les principales voies métaboliques. L'ochratoxine  $\alpha$  (OT $\alpha$ ) formée par le clivage de la liaison peptidique de l'OTA est le principal métabolite chez l'homme. L'OT $\alpha$  est considérée comme un produit non toxique. Cependant, la forme ouverte de l'OTA résultant de l'ouverture de lactone (OP-OTA), chez les rongeurs, est plus toxique que l'OTA. La 4-hydroxyochratoxine A (4-OHOTA) est le principal produit hydroxylé chez les rongeurs, l'isomère 4S chez le porc et la 10-OH-OTA chez le lapin. D'autre part, l'OTA peut être déchlorée pour produire l'ochratoxine B (OTB), ce dernier peut être métabolisé en 4-OH-OTB ou ochratoxine  $\beta$  (OT $\beta$ ). On distingue aussi l'ochratoxine C (OTC) qui est l'ester éthylique de l'OTA. L'ochratoxine quinone/hydroquinone (OTQ/OTHQ) est le métabolite de l'OTA chez les animaux. Finalement, les conjugués de l'OTA tels que les conjugués hexose et pentose peuvent se former chez les animaux. Ces métabolites polaires permettent l'élimination rapide de l'OTA [60].

### **I.3.2 L'ochratoxine B (OTB)**

L'OTB, analogue déchloré de l'OTA, est également un contaminant alimentaire toxique, bien que sa présence dans les denrées alimentaires soit moins importante que celle de l'OTA. En effet, le ratio de biosynthèse de l'OTA/OTB est approximativement 5:1 par *Aspergillus ochraceus* et différentes espèces de *Penicillium* [61]. L'OTB est donc présente dans les produits contaminés par l'OTA mais à des concentrations plus faibles [62].

Malgré la structure apparentée, l'OTB est beaucoup moins toxique que l'OTA. Mally *et al* [63] ont démontré que l'OTA et l'OTB possèdent un potentiel cytotoxique similaire *in vitro*, mais un potentiel néphrotoxique différent chez les rongeurs. L'OTB est plus facilement métabolisée et est plus rapidement éliminée que l'OTA. L'absence de rétention spécifique de l'OTB dans les reins et la différence dans la toxico-cinétique peuvent expliquer la faible toxicité de l'OTB.

Tableau 3: Structures chimiques de l'OTA et ses métabolites [60]

Composé					
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Ochratoxine A (OTA)	Phenylalanyl	Cl	H	H	H
Ochratoxine B (OTB)	Phenylalanyl	H	H	H	H
Ochratoxine C (OTC)	Phenylalanyl+CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	H	H	H
Ochratoxine α (OTα)	OH	Cl	H	H	H
Ochratoxine β (OTβ)	OH	H	H	H	H
4-(R)-hydroxyochratoxine A	Phenylalanyl	Cl	H	OH	H
4-(S)-hydroxyochratoxine A	Phenylalanyl	Cl	O H	H	H
10-hydroxyochratoxine A	Phenylalanyl	Cl	H	H	OH
4-R-hydroxyochratoxine B	Phenylalanyl	H	H	OH	H
OTHQ	Phenylalanyl	OH	H	H	H
Ochratoxine A methyl ester	Phenylalanyl, methyl ester	Cl	H	H	H
Ochratoxine B methyl ester	Phenylalanyl, methyl ester	H	H	H	H
4-R-Hydroxyochratoxine A-β-glucoside	Phenylalanyl	Cl	H	Oglucopyranosyl	H

### I.3.3 L'ochratoxine hydroquinone (OTHQ)

L'OTHQ est l'un des métabolites réactifs de l'OTA produit par un processus de déchloration oxydative. Il est formé dans les cultures cellulaires mais aussi chez les animaux. L'OTHQ a été détectée dans l'urine des rats mâles traités avec des concentrations élevées d'OTA (2mg/Kg) pendant deux semaines par LC-SM/SM. Cependant ce métabolite est présent à l'état de traces. Des fortes concentrations d'OTHQ sont produites quand l'OTB est incubée avec la Peroxidase de Raifort (HRP). Le couple redox hydroquinone/quinone

(OTHQ/OTQ) joue un rôle très important dans la toxicité de l'OTA. Il a été suggéré que la biotransformation de l'OTA en OTHQ/OTQ entraîne la formation d'oxygène réactif due au cycle redox favorisant donc les dommages oxydatifs de l'ADN [64].

## **II. Les aptamères: bio-éléments de reconnaissance utilisés**

Le terme aptamère est dérivé du latin «aptus» signifiant «apte, se lier, s'adapter» et du suffixe grec «meros» signifiant l'unité de base composant un polymère [65]. Le terme désignant un polymère adapté à une fonction est basé sur la forte interaction entre l'oligonucléotide simple brin et une cible spécifique en se basant sur la conformation structurale. Les aptamères sont des oligonucléotides simples brins ARN ou ADN sélectionnés à partir d'une banque aléatoire selon leur aptitude à reconnaître une cible avec une forte affinité et spécificité [66].

### **II.1 La technologie du SELEX**

Les études récentes de la complexité des génomes, transcriptomes et des protéomes des vivants ont montré la combinatoire immense des acides nucléiques et des protéines. La chimie combinatoire est une technique très importante dans le domaine industriel, biotechnologique et pharmaceutique, utilisée dans la découverte de nouveaux médicaments, catalyseurs ou de molécules ayant des propriétés spécifiques. Cette approche à la fois moléculaire et statistique est caractérisée par la synthèse et la sélection simultanée de bibliothèques de composés apparentés, mais qui diffèrent structurellement, afin d'identifier et isoler des molécules fonctionnelles. L'utilisation des acides nucléiques dans une méthode combinatoire présente plusieurs intérêts. Les oligonucléotides sont capables de se replier en structures secondaire et tertiaire, et peuvent être facilement amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction) ou transcription *in vitro*. Des bibliothèques complexes contenant jusqu'à  $10^{15}$  séquences oligonucléotidiques aléatoires différentes peuvent être synthétisées et sélectionnées en parallèle par synthèse chimique pour une propriété particulière; forte affinité pour une cible donnée (aptamères) ou une activité catalytique (ribozymes, DNAzymes...) [67].

## II.1.1 Principe général du SELEX

Le SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) est une procédure de chimie combinatoire qui permet une sélection rapide, à partir d'une librairie de séquences nucléotidiques aléatoires, des oligonucléotides ayant une affinité élevée pour une molécule cible donnée [36]. Comme les repliements d'une séquence nucléotidique dans l'espace dépendent de sa structure primaire, la librairie d'oligonucléotides se présentera comme une population de formes offrant plusieurs sites de reconnaissance avec d'éventuels groupements susceptibles de s'associer à une cible *via* des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogène ou des interactions hydrophobes. Il est donc très probable que dans une population suffisamment riche, se trouve une forme tridimensionnelle adaptée à la reconnaissance de la cible choisie [68].

La méthode du SELEX repose sur des mécanismes souvent attribués au processus d'évolution Darwinien; diversité, sélection et réplication [36]. Le SELEX comporte trois principales étapes; la sélection des séquences qui se lient à la cible, séparation des aptamères des non-aptamères par des méthodes d'affinité et amplification des aptamères sélectionnés [69]. Trois facteurs importants déterminent la puissance de la stratégie pour une banque donnée; la diversité moléculaire de la banque, la finesse du crible et la sensibilité des méthodes analytiques [70].

Le SELEX consiste à des cycles itératifs (7 à 15) d'alternance entre la sélection (liée à la forme) et l'amplification (liée à la séquence) permettant de diriger l'évolution de la population selon un mode darwinien. Cette évolution dépend des conditions de sélection; l'astringence (concentration, temps d'incubation, lavages...) est augmentée au fil des cycles de façon à favoriser la capture des candidats les plus affins dans la population, d'où le nom «aptamères» donné aux oligonucléotides présentant le caractère désiré, issus de la sélection (Figure 2) [70].

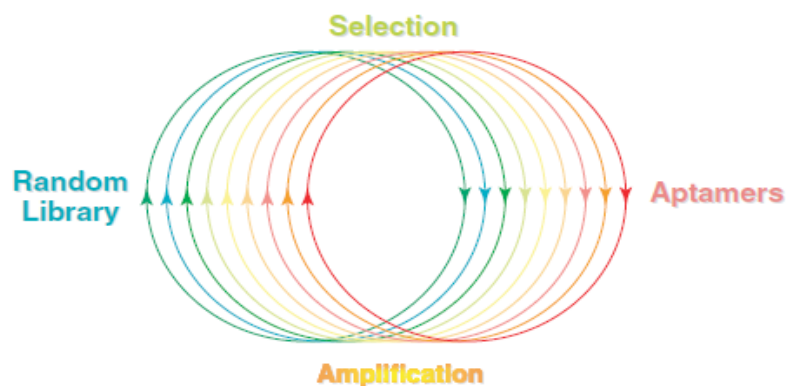


Figure 2: Schéma de la sélection in vitro [71].

Random library=Banque aléatoire.

## II.1.2 Molécules cibles

Depuis 1990, le SELEX a été appliqué sur une variété de molécules cibles. Les premières applications du SELEX ont servi à sélectionner des aptamères ARN pour des colorants organiques [65] et pour l'ADN polymérase T4 [72]. Ellington *et al* [73] ont également décrit la sélection du premier aptamère ADN ayant la même affinité que l'aptamère ARN pour les colorants organique. Depuis, des cibles très variées ont été visées pour générer des aptamères: petites molécules organiques[74, 75] et inorganiques[76], acides aminés[77], peptides et protéines [78, 79], enzymes[80], carbohydrates [81]ou antibiotiques[82] mais aussi des structures complexes comme des mélanges de cibles, des virus intacts [83]ou des cellules vivantes.

Le SELEX est mieux adapté pour les molécules qui possèdent la surface nécessaire pour l'interaction avec l'aptamère. La molécule cible doit être stable et facilement modifiée afin de faciliter la sélection. Elle doit être d'une grande pureté et présente en quantité suffisante, ce qui améliore la spécificité de la sélection en réduisant les interactions non-spécifiques avec les oligonucléotides. Les groupements positivement chargés d'une molécule cible (par exemple groupement amine primaire), la présence de donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène et la planarité peuvent faciliter la sélection d'un aptamère [84, 85]. La sélection peut être plus difficile dans le cas des molécules hydrophobes chargées négativement (par exemple des molécules contenant des groupements phosphates). Ces exigences sont basées sur les principes des interactions intermoléculaires dans un complexe cible-aptamères [67].



## II.1.3 La complexité de la librairie d'oligonucléotides

Un calcul simple peut montrer que la combinatoire des acides nucléiques est immense. Pour une séquence de 200 nucléotides, on peut engendrer  $4^{200}$  séquences différentes ( $10^{120}$ ) à partir des 4 unités constituant l'ADN ou l'ARN. La biologie moléculaire permet aujourd'hui de générer des aptamères pour différentes applications. Le processus du SELEX commence par la synthèse chimique d'une banque aléatoire d'oligonucléotides simple brin. Chaque oligonucléotide comporte une région centrale variable de  $n$  (20 à 80) nucléotides encadrée, en 3' et en 5', de séquences définies identiques pour tous les candidats de la banque. Ces régions fixes, contenant chacune de 18 à 21 nucléotides, constituent des sites de liaison des amorces lors de l'amplification par PCR. La complexité de la librairie dépend du nombre  $n$  de nucléotides dans la région variable. La taille de cette région dicte la diversité de la banque qui est  $4^n$ , puisque chaque position peut être occupée par l'un des quatre nucléotides A, T, G ou C [70]. Généralement, le cycle du départ contient autour de  $10^{15}$  séquences individuelles possédant chacune une région variable de 25 nucléotides, une taille qui offre une forte probabilité de sélectionner un aptamère spécifique de la molécule d'intérêt [86]. Les aptamères les plus affins sélectionnés par SELEX représentent 1 de  $10^9$  à  $10^{13}$  de candidats de la librairie [87]. Bock *et al*, ont montré qu'une librairie contenant une courte région variable est suffisante pour la sélection d'un aptamère. Ce type de librairie est facilement gérable, moins coûteux et la sélection d'un aptamère de courte séquence est préférée pour diverses applications [88]. Cependant, une région variable plus longue augmente la complexité de la banque ce qui est très important pour la sélection d'aptamères pour des cibles n'ayant pas la propriété de se lier aux acides nucléiques. Un pool de séquences plus longues peut offrir plus de chance pour identifier un aptamère [89].

## II.1.4 La sélection

L'étape de sélection comprend l'incubation de la molécule cible avec la banque d'oligonucléotides, la séparation des oligonucléotides libres et l'élution de ceux associés à la cible. Cette étape vise à identifier ces oligonucléotides à partir de la variété de la banque avec une grande affinité et spécificité pour la cible d'intérêt. La banque est donc mise en contact avec la molécule cible dans un tampon approprié et sous certaines conditions de pH et de température pendant un temps d'incubation donné. Généralement, on commence par un faible

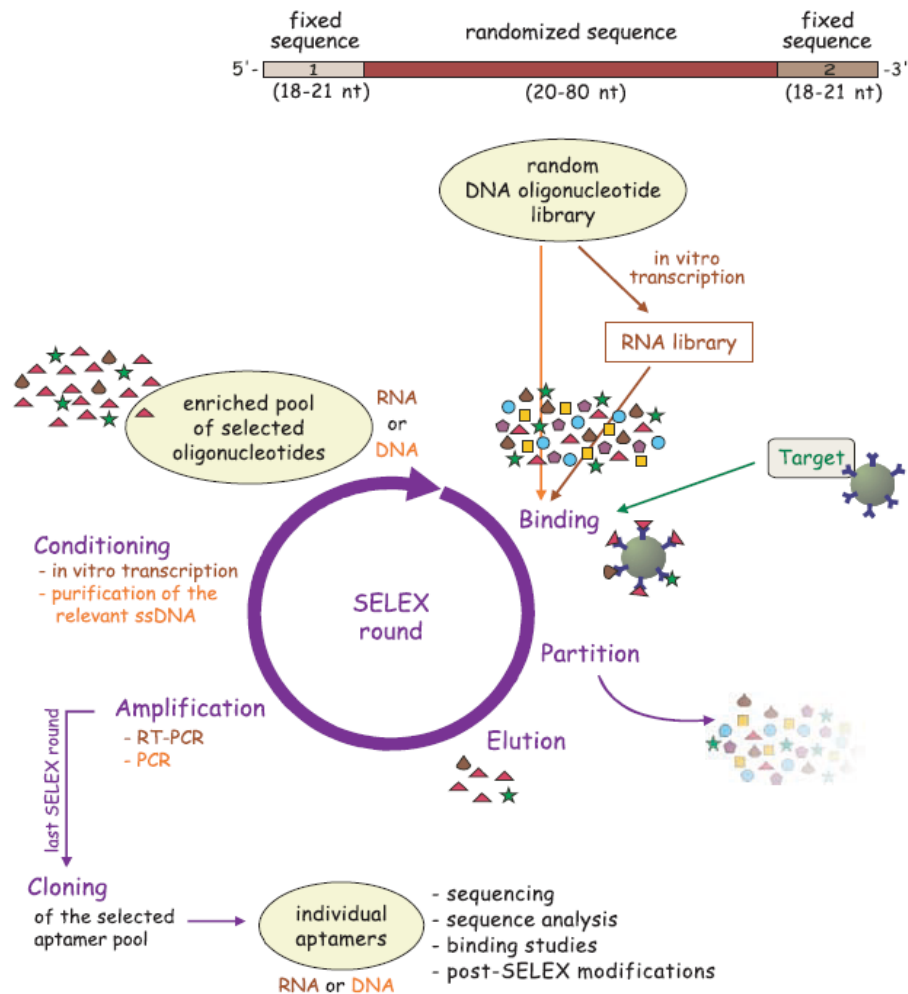


Figure 3: Protocole de sélection in vitro d'aptamères par la technologie du SELEX [71].

Randomized sequence=séquence aléatoire, fixed sequence=séquence fixe, random DNA oligonucleotide library=banque d'oligonucléotides ADN aléatoire, enriched pool of selected oligonucleotides=pool enrichi des oligonucléotides sélectionnés, target=cible, binding=fixation, séquencing=séquençage, conditioning=conditionnement, purification of the relevant ssDNA=purification de l'ADN simple brin sélectionné, last selex round=dernier cycle du SELEX.

ratio banque d'oligonucléotides / molécule cible afin d'évaluer la fixation de la cible par toutes les molécules [89].

Une des étapes cruciales du SELEX est la séparation efficace entre les oligonucléotides liés et non liés à la cible. L'immobilisation de la cible sur une matrice particulière permet une séparation effective. La méthode conventionnelle de séparation est l'utilisation de la chromatographie d'affinité en immobilisant la cible sur des supports de sépharose ou d'agarose [90, 91]. Cependant, cette méthode nécessite des quantités importantes de la cible pour un chargement efficace de la colonne. Les billes magnétiques

sont également utilisées dans l'immobilisation de la cible [92-95]. Cette méthode est relativement simple, automatisable et implique une plus faible quantité de cible.

Une autre méthode de séparation sans immobilisation de la molécule cible est utilisée, il s'agit d'une ultrafiltration par des filtres de nitrocellulose avec différents MWCO (Molecular Weight Cut-Offs) [36, 96, 97]. Durant les dernières années, d'autres méthodes de séparation ont été décrites comme l'électrophorèse capillaire [79, 83, 98], la cytométrie en flux [99, 100], le retard sur gel [101], la résonance des plasmons de surface [102] et la centrifugation [103]. Gopinath *et al* [69] ont bien décrit dans une revue toutes les méthodes de séparation utilisées dans la procédure du SELEX.

Après l'élimination des oligonucléotides non liés, généralement, les molécules liées sont éluées de la cible pour une prochaine utilisation dans les étapes suivantes du SELEX. L'éluotion peut être réalisée par chauffage [92] ou par addition d'une substance dénaturante comme l'urée, le SDS ou l'EDTA [96, 104, 105]. Dans d'autres études, la cible [77, 106] ou une autre molécule compétitive [107] ont été utilisées dans l'éluotion. Cho *et al* ont développé une méthode de photo-éluotion en appliquant un linker photo clivable [108].

## **II.1.5 L'amplification**

Vue la complexité de la banque initiale d'oligonucléotides, seuls quelques oligonucléotides fonctionnels seront conservés après la sélection. Une étape d'amplification, consistant à cloner les candidats sélectionnés par PCR, est donc nécessaire pour reconstruire une banque enrichie avant d'entamer un nouveau cycle. Cette amplification permet, non seulement, d'enrichir le pool d'aptamères sélectionnés mais également d'attacher certaines modifications en utilisant des amorces spéciales durant la PCR. Il est possible d'attacher des groupes fonctionnels aux aptamères ADN pour la détection, l'immobilisation, l'extension...etc [67].

Cependant, les polymérases utilisées étant infidèles et introduisant des erreurs à un taux de l'ordre de  $10^{-4}$ , elles contribuent à enrichir significativement la diversité du pool de séquences tout au long du processus SELEX: un candidat sur 100 sera modifié à chaque cycle d'amplification pour une banque avec une région aléatoire de 100 nucléotides [70]. Ainsi, lorsqu'un oligonucléotide possédant un motif de reconnaissance de la cible est sélectionné, son amplification va générer des mutants de structure proche, non présents dans la banque de

départ, et dont certains présentent peut être une meilleure affinité que l'oligonucléotide sélectionné. Par conséquent, ces mutations peuvent permettre l'évolution des candidats vers des descendants de plus forte affinité.

### **II.1.6 Séparation des brins de l'ADN issu de l'amplification**

Après amplification par PCR, le pool enrichi est constitué d'ADN double brin. Une étape de purification de l'ADN simple brin est nécessaire afin de préparer les séquences sélectionnées au prochain cycle du SELEX. A cet effet, Plusieurs méthodes peuvent être utilisées, mais celles basées sur le système biotine/streptavidine sont les plus employées. Cela peut être réalisé en ajoutant la biotine au brin indésirable suivie par une électrophorèse pour distinguer les deux brins [109]. L'ADN double brin contenant un brin biotinylé peut être aussi lié à des surfaces (billes, plaques) modifiées avec la streptavidine et les deux brins sont séparés par dénaturation [110, 111].

### **II.1.7 Clonage et séquençage**

Au cours des procédures du SELEX, la complexité de la banque initiale diminue et les candidats sélectionnés sont enrichis. Cette succession d'étapes de sélection et d'amplification sera répétée jusqu'à atteindre l'affinité maximale (généralement entre 7 et 15 cycles itératifs) et les séquences sélectionnées sont à la fin déterminées. Pour cela, le pool final est cloné dans un vecteur bactérien et les colonies individuelles sont séquencées. Le nombre d'aptamères obtenus qui peut varier de 1 à 1.000.000 dépend des conditions et de l'astringence de la sélection [112]. Des alignements séquentiels sont utilisés pour évaluer la complexité des aptamères sélectionnés et de les identifier avec des séquences homologues. Cela est généralement réalisé informatiquement en utilisant le programme clustal W.

La structure secondaire est ensuite analysée afin de rechercher les motifs de reconnaissance de la cible. Ces analyses sont généralement réalisées en utilisant le programme *mfold*. Ce programme prédit la possible configuration de l'ADN simple brin par minimisation d'énergie en considérant les tiges et les boucles. Les motifs déterminés sont généralement localisés dans les structures boucle-tige [113, 114].

Les études d'affinité et de spécificité constituent une importante partie dans la sélection d'un aptamère. La constante d'affinité (constante de dissociation  $K_D$ ) est un paramètre caractéristique d'un aptamère, un faible  $K_D$  montre l'affinité élevée de l'aptamère envers sa cible [67]. Finalement, l'interaction aptamère-cible est définie en analysant la structure tridimensionnelle du complexe par spectroscopie RMN, cristallographie aux rayons X ou cristallisation [115, 116].

## **II.1.8 Avantages et limitations du SELEX**

Depuis sa découverte en 1990, la technologie du SELEX a été utilisée dans la sélection de centaines d'aptamères capables de reconnaître leur cible avec une spécificité et une affinité élevées. Cela reflète l'importance de cette technique dans ce domaine de recherche ainsi que son énorme potentiel dans les analyses pharmaceutiques, médicales et environnementales.

Le processus du SELEX est applicable à différentes classes de cibles, outre les molécules simples, des molécules dont la structure est complexe ou inconnue peuvent être visées pour générer des aptamères. De plus, toute la sélection est réalisée *in vitro*, le SELEX est donc applicable sous des conditions non-physiologiques. Il est aussi possible de sélectionner des aptamères contre des molécules toxiques sans ou avec une faible immunogénicité.

Cependant, le problème d'enrichir des aptamères non spécifiques est souvent rencontré. Cela peut être résolu par des cycles de contre-sélection multipliés. L'absence d'un protocole SELEX standardisé pour toutes les molécules cibles nécessite d'adapter les conditions de sélection selon la cible étudiée, les caractéristiques voulues de l'aptamère et ses applications [67].

## **II.2 Propriétés des aptamères**

### **II.2.1 La taille**

Il a été déjà noté que la taille des séquences de la plupart des bibliothèques utilisées en SELEX excède ou est proche, de la limite pratique des molécules manipulables. De plus, afin de réduire le coût de synthèse et de favoriser l'accessibilité de l'aptamère pour sa cible, il est

préférable que sa séquence soit la plus courte possible. En outre, la séquence de l'aptamère, retenu initialement d'une sélection *in vitro*, est encadrée par deux régions fixes impliquées dans l'amplification qui peuvent allonger la séquence de 50 nucléotides. La détermination du plus court segment d'ADN capable de reconnaître la cible peut être réalisée par la combinaison d'analyse de délétion, «footprinting» et de synthèse *in vitro*[117]. Généralement, la taille d'un aptamère est inférieure à 100 nucléotides. L'aptamère de la thrombine, constitué de 15 nucléotides, est l'un des aptamères les plus courts [88]. Le motif minimal des aptamères spécifiques du VEGF (Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) comprend entre 23 et 35 nucléotides [118]. L'aptamère de l'OTA est composé de 36 nucléotides [119], celui de la streptomycine est de 46 nucléotides [120], et la région minimale de l'aptamère spécifique d'une protéase à sérine du sang (la protéine C) est de 99 nucléotides[121]. Ces résultats fournissent une masse de l'aptamère variant de 7,5 à 32 kDa sachant qu'une masse de 10 kDa est assez courante.

## II.2.2 L'affinité

La constante de dissociation  $K_D$  est un paramètre primordial pour déterminer la capacité d'un aptamère à fixer sa cible. L'affinité est inversement proportionnelle à la valeur de la constante  $K_D$ . L'affinité dépend sur les conditions du SELEX et les propriétés de la molécule cible tels que les groupements fonctionnels. En effet, des effets électrostatiques et hydrophobes gouvernent généralement les interactions entre deux molécules et, les liaisons hydrogène sont particulièrement importantes pour la reconnaissance des acides nucléiques. De plus, une complémentarité de forme est également cruciale. Une affinité importante pour une molécule cible devrait être obtenue avec des ligands possédant une adéquation parfaite de forme pour la molécule cible et une distribution de charges parfaitement complémentaire. Au contraire, une conformation flexible est un facteur majeur limitant l'affinité et la spécificité d'interaction [122].

Généralement, pour des molécules cibles de faible poids moléculaire, les aptamères identifiés sont caractérisés par des  $K_D$  de l'ordre du micromolaire tandis que pour des cibles protéiques, des  $K_D$  de l'ordre du nanomolaire et du picomolaire sont parfois obtenues. Cela peut être expliqué par le fait que toutes les petites molécules sont moins rigides. Ainsi, ces molécules devront posséder la bonne conformation pour se fixer à l'oligonucléotide, sinon un coût entropique sera nécessaire pour que la molécule cible présente sa bonne conformation

[123]. D'autre part, la surface d'interaction d'une petite molécule est moins importante que celle d'une protéine. Le nombre de groupements fonctionnels disponibles pour la fixation est donc plus faible. Une affinité importante pour une petite molécule peut être obtenue seulement avec une complémentarité de forme et d'interactions à travers ses quelques groupements fonctionnels disponibles [122].

### **II.2.3 La spécificité**

La spécificité peut être définie comme la capacité de discrimination entre des molécules en compétition pour un ligand commun. Une telle discrimination est généralement le résultat de différence d'énergie libre d'interaction, mais dans le cas des aptamères, des discriminations cinétiques existent également. Comme l'affinité, la spécificité dépend de deux facteurs: l'adéquation de forme entre l'aptamère et sa cible et la complémentarité de distribution de charges [122].

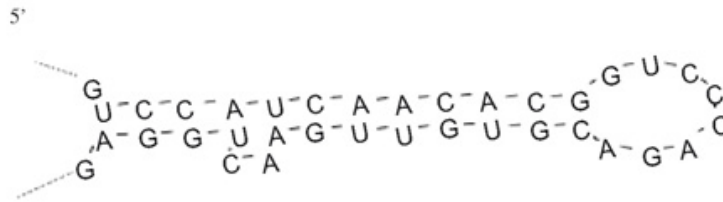
La propriété la plus remarquable des aptamères est la spécificité des interactions engagées avec leur cible, ce qui en fait des molécules de reconnaissance prometteuses. Différentes enzymes ayant la même activité peuvent être discriminées, par exemple la thrombine  $\alpha$  et  $\gamma$  [124], la transcriptase inverse du virus félin de l'immunodéficience et ses enzymes homologues des trois autres rétrovirus [125] ainsi que deux iso-enzymes de la protéine kinase C différentes dans 23 résidus [126]. C'est également le cas de l'OTA et son homologue déchloré l'OTB, L'aptamère anti-OTA est très spécifique puisque son affinité pour l'OTB est 100 fois plus faible que pour l'OTA [119].

Dans certains cas, la spécificité est limitée par la réactivité croisée. Les aptamères de la co-enzyme A reconnaissent l'AMP [127], ceux sélectionnés contre la xanthine reconnaissent la guanine [116] et ceux sélectionnés contre la cellobiose reconnaissent la cellulose [128]. Cela peut être résolu au cours de l'étape de contre sélection. C'est le cas de l'aptamère sélectionné contre la théophylline. L'utilisation de cycles de contre sélection avec la caféine a permis d'obtenir une différence d'affinité entre ces deux molécules qui diffèrent par un groupe méthyle d'un facteur de 10000 [129].

## II.2.4 La structure des aptamères

L'activité des aptamères est basée sur leur structure tridimensionnelle qui, à son tour, dépend de la séquence primaire. La structure primaire correspond à la séquence des acides nucléiques. Elle se replie suite à la formation de paires de bases et de motifs structuraux pour générer des structures secondaire et tertiaire. On dit que l'hélice est la structure secondaire de

(A) 5'GGGCCACGAUUGUCGAGUCCAUCAACACG**GUCCAGAC**CGUGUUGAACUGGAGAUC



(B)

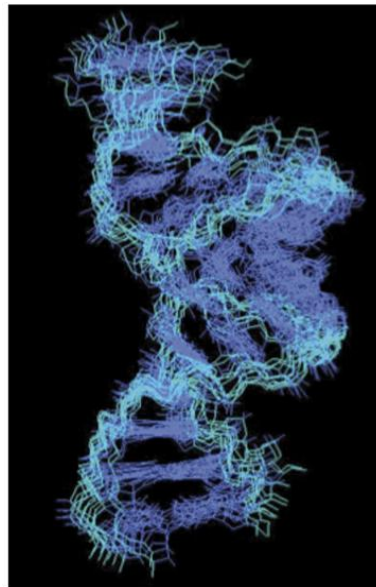


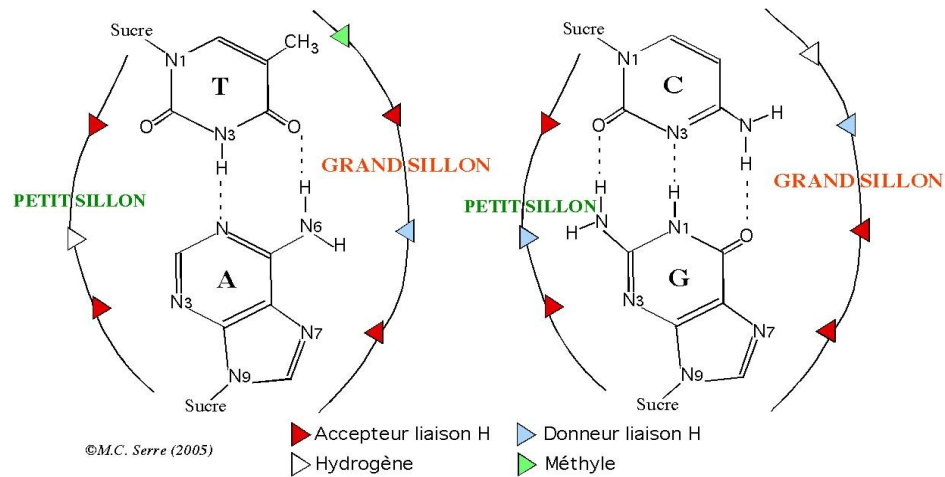
Figure 4: (A) Séquence primaire et structure secondaire d'un aptamère sélectionné contre l'élément TAR du VIH-1. Le motif consensus identifié au terme de la sélection est indiqué en gras dans la séquence primaire et les parties complémentaires qui constituent une tige double brin sont soulignées. (B) Structure tertiaire déterminée par étude de résonance magnétique nucléaire de l'aptamère sélectionné contre l'élément TAR du VIH-1, associé à sa cible [70].

base des oligonucléotides, tandis que la structure tertiaire décrit l'arrangement suprahélicoïdal de la molécule (**Figure 4**).



## II.2.4.1 La structure secondaire

Dans la structure secondaire, les bases de la séquence primaire s'apparient grâce à des liaisons hydrogènes. Il se forme deux liaisons H entre l'adénine (A) et la thymine (T) ou l'uracile (U) pour l'ARN et trois liaisons H entre la guanine (G) et la cytosine (C) pour donner les paires de bases dites canoniques ou Watson-Crick. Les liaisons hydrogènes unissent les



**Figure 5:** Paires de bases canoniques et leur appariement par liaisons hydrogène. Le petit et le grand sillon de l'hélice.

parties complémentaires en formant une hélice. Elle présente un grand sillon (profond et large) et un petit sillon (étroit et peu profond) (**Figure 5**). Les sillons représentent des zones d'interactions favorables. Cependant, la spécificité de ces sites est à priori limitée, car les groupements fonctionnels des bases, orientés vers l'intérieur restent peu accessibles.

La force de la liaison entre deux régions associées dépend du nombre de paires de bases appariées consécutives, de la présence d'éventuels mésappariements et également de la proportion de paires G/C, cette paire étant plus stable que la paire A/T(U).

D'autres appariements de bases non canoniques peuvent créer des déformations locales au sein de l'hélice. Il s'agit de l'association de deux bases consécutives, l'empilement (stacking) des bases (base zipper) ou par association selon (Wobble, Hoogsteen). Ces déformations permettent des interactions spécifiques avec la molécule cible. Les triplets de bases, triples hélices et les tétrades de G sont stabilisés par de telles interactions et constituent des structures propices à la fixation d'un ligand donné [66].

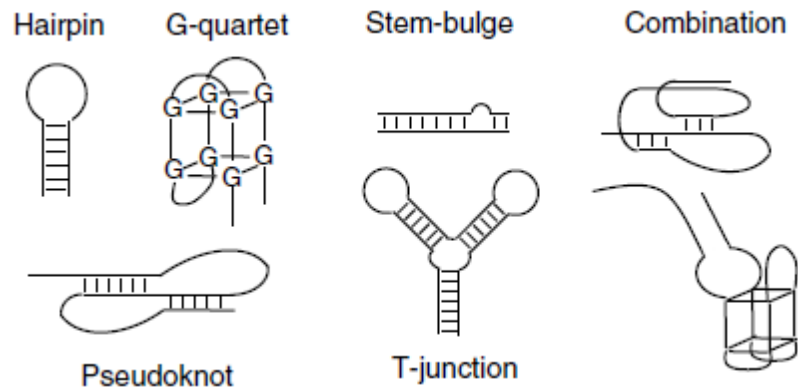
## II.2.4.2 Les motifs structuraux et la structure tertiaire

Les régions charnières de bases non appariées adoptent des conformations très variées: saillies, jonctions, boucles, pseudo-nœuds... (**Figure 6**) [130]. La présence d'une ou plusieurs bases non appariées crée une saillie au sein d'une hélice. Une saillie est une région dans laquelle un brin contient une base superflue sans base complémentaire sur l'autre brin. Elle peut être orientée vers l'intérieur de l'hélice et stabilisée par «stacking» ou rejetée vers l'extérieur, et fournissent alors par leur exposition un site d'interaction privilégié. La zone de connexion entre deux hélices orientées différemment s'appelle une jonction ou «turn».

Lorsqu'un brin se replie sur lui-même pour former une double hélice, une autre structure appelée «en épingle à cheveux» ou «tige-boucle» se forme. Elle se forme lorsque deux régions contenant des séquences répétées inversées de bases complémentaires s'apparient pour former localement une structure en double hélice. La stabilité de cette structure dépend de la stabilité de l'hélice formée et de la longueur de la région non appariée (boucle), généralement comprise entre 4 et 8 nucléotides. Certaines boucles, appelées «tétraboucles» (*tetraloops*), sont particulièrement stables du fait de l'appariement des premières et dernières bases, d'un fort empilement et d'un réseau de liaisons hydrogène. Des structures très compactes de type pseudo-nœuds peuvent également se former par appariement entre les nucléotides de la boucle d'une tige-boucle et un autre brin à l'extérieur de la tige. Les pseudo-nœuds sont caractéristiques des aptamères ARN mais ils sont également présents dans les aptamères ADN [131]. Des tétrades de G ou «G-quadruplexes» peuvent être formées par des appariements de base de type Hoogsteen formant un plateau de 4 guanines (G), aussi nommé «quartet». L'empilement parallèle et ininterrompu d'au moins 3 quartets, intercalés par un cation monovalent, le potassium généralement, entraîne une structure très stable constituée de quatre brins. Le G-quadruplex est le motif le plus typique des aptamères ADN [131]. L'empilement d'hélices et le compactage de l'ensemble sont enfin la conséquence d'interactions entre boucles: deux boucles « s'embrassent » (kissing complexes) par appariement de leurs résidus complémentaires, ou encore une boucle s'insère soit dans une hélice, soit au sein d'une structure réceptrice complémentaire «docking».

Enfin, de nombreuses interactions stabilisatrices mettent en jeu des cations et des molécules d'eau, occupant des sites de coordination spécifiques définis par l'arrangement tridimensionnel local de l'oligonucléotide. À ce titre, certains cations et molécules d'eau font

partie intégrante de la structure finale de l'ensemble et sont indispensables à son maintien [66].

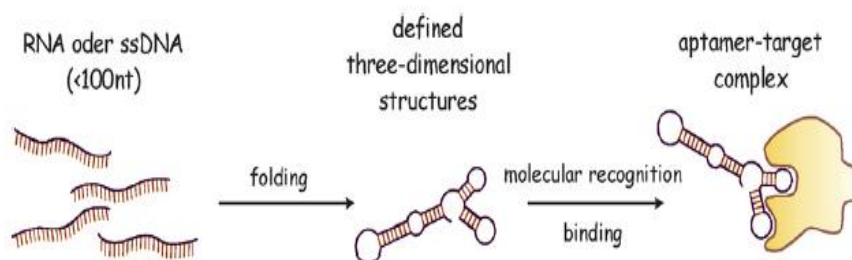


**Figure 6:** Motifs structuraux rencontrés dans les aptamères [132].

Hairpin=Tige-boucle, G-quartet=G-quadruplex, Stem-buldge=Saillie, Combination=Combinaison, Pseudoknot=Pseudo-noeud, T-junction=Jonction-T.

## II.2.5 Le complexe aptamère-cible

La structure tridimensionnelle des aptamères permet de fixer la molécule cible, que ce soit, une petite molécule, un oligosaccharide, un peptide, une protéine ou une structure complexe (**Figure 7**). La reconnaissance moléculaire de l'aptamère repose sur une complémentarité de forme, des interactions d'empilement «stacking» entre les composés aromatiques et les bases nucléiques de l'aptamère, des interactions électrostatiques entre les groupements chargés ou des liaisons hydrogène [133].



**Figure 7:** Représentation schématique de la reconnaissance d'une molécule cible par un aptamère [67].

RNA oder ssDNA= ARN ou ADN simple brin, defined three-dimensional structures=structures tridimensionnelles définies, aptamer-target complex=complexe aptamère-cible, folding=repliement, molecular recognition=reconnaissance moléculaire, binding=fixation.

Lorsque la cible est une petite molécule, il est très fréquent que l'aptamère enveloppe totalement ou en grande partie sa cible, permettant ainsi une reconnaissance spécifique. Le repliement de l'aptamère autour de sa cible permet la mise en place d'un maximum d'interactions intermoléculaires discriminantes.

La structure de certains complexes aptamère-cible a été déterminée par marquage chimique ou enzymatique, résonance magnétique nucléaire ou par diffraction aux rayons X.

### ***Exemple de l'aptamère de la thrombine***

Isolé par Bock *et al*, l'aptamère de la thrombine est l'un des aptamères les plus courts (15 nucléotides) dont la séquence est GGTTGGTGTGGTTGG [88]. La RMN a démontré que ce court oligonucléotide ADN se replie en une structure à 4 brins stabilisée par deux tétramères G, chaque double brin contient une boucle d'un dinucléotide TT (**Figure 8**).

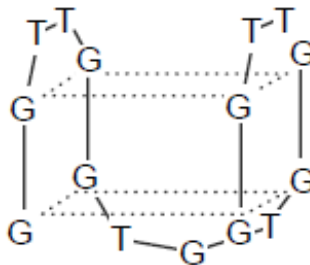


Figure 8: Représentation schématique de l'aptamère de la thrombine [117].

La cristallographie aux rayons X de l'aptamère lié à sa cible a révélé que l'aptamère est pris en sandwich entre deux molécules de thrombines chargées positivement (**Figure 9**). Les structures résolues par RMN ou par cristallographie sont très proches. Cependant, la polarité des brins est différente. Les deux boucles TT longent le sillon majeur dans le modèle résolu par cristallographie alors qu'elles traversent le sillon mineur dans le modèle élucidé par RMN [117].

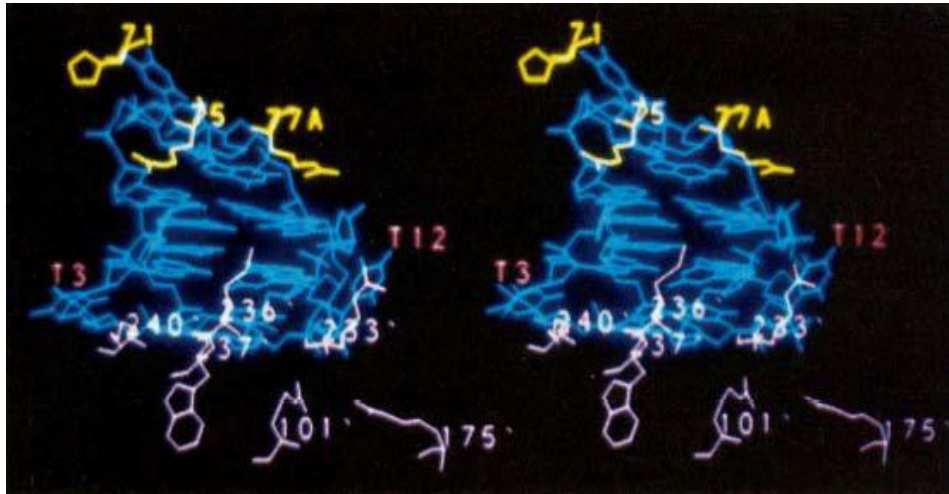


Figure 9: Représentation de l'interaction de l'aptamère avec la thrombine : l'aptamère en bleu, les chaînes latérales de la thrombine chargées positivement sont représentées en jaune (exosite fibrinogène) et en rose (site héparine) [134].

## II.3 Applications des aptamères

### II.3.1 Applications thérapeutiques

Outre la forte affinité, certains aptamères possèdent des activités inhibitrices pour leurs cibles protéiques et peuvent être facilement synthétisés dans la cellule par son propre matériel génétique. Ces aptamères, appelés intramères, ont été souvent utilisés à des fins thérapeutiques. Par exemple, l'aptamère sélectionné contre la protéine VIH-1 Rev, possède des propriétés inhibitrices de la production du virus qui ont été démontrées dans un modèle cellulaire [135].

Le premier aptamère sélectionné contre une cible protéique extracellulaire est l'aptamère antithrombine qui possède également un fort potentiel thérapeutique. L'analyse structurale de sa séquence a montré qu'une de ses boucles interagit avec le site de liaison de l'héparine et l'autre avec le site de liaison du fibrinogène entraînant ainsi un effet anticoagulant. Vu la très brève demi-vie des oligonucléotides non modifiés dans la circulation sanguine, cet effet disparaît instantanément après la fin de la perfusion de l'aptamère. Cette dégradation par les nucléases sanguines est considérée comme un avantage car elle évite tout saignement incontrôlable due à la lente réversion de l'effet [66]. Un autre aptamère a été sélectionné contre le facteur de coagulation IXa à partir d'une banque d'oligonucléotides modifiés afin de ralentir sa clairance sanguine. Cependant, ils ont utilisé

une séquence complémentaire à celle de l'aptamère appelée «antidote», et qui, en s'associant à celui-ci, libère la molécule cible et arrête l'effet anticoagulant [136].

Certains aptamères possèdent un fort potentiel *in vivo* comme molécule d'adressage [137]. Par exemple, l'aptamère sélectionné contre l'élastase neutrophile humaine ne possède pas d'effet inhibiteur. Cependant, en l'associant à un peptide inhibiteur, il assure le transport de cet inhibiteur à sa cible en augmentant d'un facteur de 100 000 l'inhibition provoquée par le peptide seul [138].

Actuellement, plusieurs aptamères sont utilisés dans le domaine thérapeutique contre diverses pathologies (maladies auto-immunes, cancers, inflammation...). Le premier aptamère approuvé est l'anti VEGF [139], cet aptamère lié à un bras PEG (Polyéthylène Glycol) est appelé pegaptanib et est utilisé comme traitement médical de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Le produit pharmaceutique Macugen de Pfizer Inc./OSI Pharmaceuticals a été approuvé en 2004 aux Etats Unis et en 2006 en Europe [140, 141].

### **II.3.2 Applications analytiques**

La possibilité de sélectionner des aptamères pour une variété de cibles a conduit à l'utilisation des aptamères dans de nombreuses applications analytiques. Vues les propriétés des aptamères évoquées précédemment, les aptamères ont été, récemment, largement utilisés en chimie analytique en tant que ligands immobilisés ou dans des essais homogènes.

Les aptamères peuvent être fixés à un support solide et utilisés comme outils de purification en chromatographie d'affinité [142], fixés à une puce et utilisés en SELDI-MS (*Surface Enhancement Laser Desorption/ Ionization-Mass Spectrometry*) [143]. Les aptamères ont été utilisés comme alternative aux anticorps dans de nombreuses techniques de détection : approche de type ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) [144], électrophorèse capillaire [145] ou cytométrie de flux. Ils sont aussi à l'origine de méthodes originales de détection.

Finalement, l'utilisation des aptamères comme éléments de reconnaissance dans le développement de biocapteurs offre plusieurs avantages par rapport aux méthodes classiques, spécialement basées sur l'utilisation d'anticorps, tels que la possibilité de régénérer les aptamères immobilisés et d'utiliser différentes méthodes de détection grâce à leur facilité de

marquage [146]. Ils peuvent être utilisés dans des biocapteurs électrochimiques [147], optiques [148]...etc. Une revue détaillée a été récemment proposée par Tombelli *et al* pour décrire les différentes applications analytiques des aptamères [86].

L'application des aptamères dans la purification et la détection de l'OTA sera détaillée dans les paragraphes III et IV.

## **III. Méthodes d'extraction et de purification de l'OTA**

En général, les échantillons alimentaires ne peuvent être analysés qu'après une étape préliminaire de préparation, puisque les contaminants sont souvent très dilués et les matrices sont très complexes. L'extraction et la purification constituent des étapes clés dans les procédures analytiques car elles déterminent la sélectivité, la sensibilité, la précision et le rendement de la méthode. Plusieurs méthodes d'extraction de l'OTA ont été développées dans les dernières années, ayant pour objectif d'éliminer les interférents, concentrer les analytes et les transférer dans un solvant plus adapté à l'analyse, ou même fractionner l'échantillon en plusieurs groupes de composés.

### **III.1 L'extraction sur phase solide (SPE)**

#### **III.1.1 Principe**

L'extraction sur phase solide est basée sur le transfert des composés à extraire d'une phase liquide (l'échantillon) vers une phase solide (l'adsorbant). Les analytes doivent présenter une forte affinité pour la phase solide afin d'être retenus pendant l'étape de percolation de l'échantillon. Ils pourront ensuite être désorbés par un solvant de forte force éluante. Les mécanismes de rétention ou d'éluion sont basés sur les différences d'interactions moléculaires entre l'analyte, le site actif de l'adsorbant et la phase liquide.

### III.1.2 Méthode conventionnelle de l'extraction sur phase solide

La SPE conventionnelle est généralement réalisée en percolant les échantillons, à l'état liquide, sur un adsorbant placé entre deux frittés dans une cartouche (**Figure 10**). Les solutions sont percolées par simple gravité, par pression positive à l'entrée de la cartouche, par vide en sortie de la cartouche, ou par centrifugation.

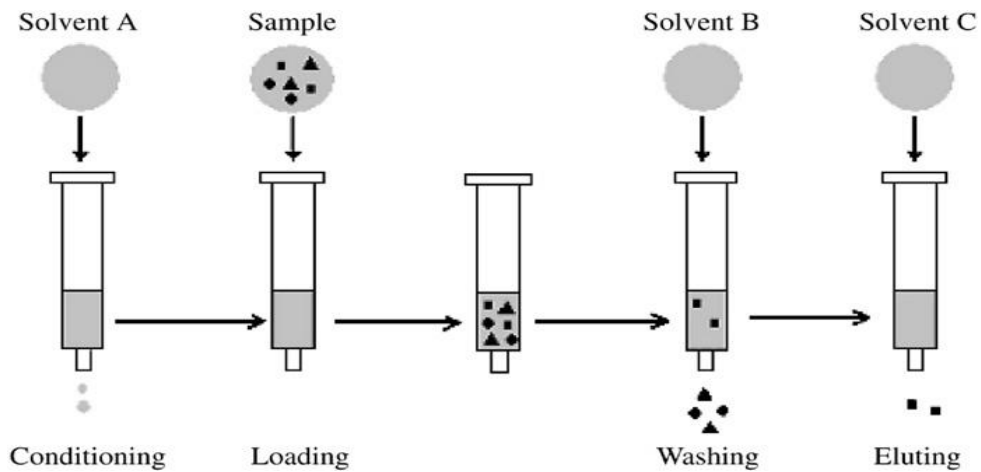


Figure 10: Protocole d'extraction sur phase solide [149].

Solvent=solvant, sample=échantillon, conditionning=conditionnement, loading=chargement, washing=lavage, eluting=élution

La première étape de l'extraction, appelée le conditionnement, est une étape d'activation avec un solvant organique ou un mélange de solvants pour permettre l'élimination des contaminants et favoriser les échanges dans l'adsorbant. Cette étape permet également une meilleure mouillabilité des frittés. L'échantillon est par la suite déposé sur la partie supérieure du lit de l'adsorbant. Les impuretés n'ayant aucune affinité avec l'adsorbant ne sont pas retenues. D'autres le sont plus ou moins fortement comparés aux composés d'intérêts. Ces impuretés sont éliminées par une étape de lavage. La solution de lavage doit avoir le plus d'affinité possible avec les impuretés et le moins possible avec les composés d'intérêt pour ne pas les éluer à l'issue de cette étape. A la fin, les molécules cibles présentes sur l'adsorbant sont récupérées pendant l'étape d'élution à l'aide d'un solvant ou d'un mélange de solvants de désorption. Le rendement d'extraction peut ensuite être déterminé en calculant le rapport entre la quantité de soluté retrouvée dans la fraction d'élution et la quantité percolée.



### **III.1.3 Paramètres de l'extraction sur phase solide**

L'adsorbant est sélectionné en fonction de la nature de l'échantillon, de manière à développer une forte rétention des analytes. La force éluante du solvant constituant l'échantillon, doit être faible vis-à-vis de l'adsorbant choisi. Généralement, des adsorbants hydrophobes sont utilisés pour l'extraction de composés dans des échantillons aqueux. La totalité des molécules cibles présentes dans l'échantillon percolé doivent rester fixées sur le support durant la percolation et le lavage. Pour cela, on doit tenir compte du volume de fin de fixation, le volume mort de la colonne et de la capacité du support.

#### **III.1.3.1 Le volume de fin de fixation $V_f$**

La perte du composé d'intérêt est souvent due à la rétention insuffisante du soluté qui est élué par le solvant qui constitue l'échantillon comme l'eau pour les échantillons aqueux. Ce volume de fin de fixation  $V_f$ , à partir duquel le soluté est élué, est donc lié à l'affinité du soluté pour l'adsorbant. Il est généralement défini au point où la concentration de l'analyte en sortie de cartouche représente 1% de la concentration percolée. Dans le cas où la même solution est utilisée pour la percolation et le lavage, la somme des deux doit être inférieure au  $V_f$  pour obtenir un rendement d'extraction de 100% [150].

#### **III.1.3.2 La capacité**

La capacité est la quantité maximale d'analyte percolée, au-delà de laquelle le rendement d'extraction n'est plus constant. Elle est dépassée lorsque la quantité de la molécule cible est supérieure au nombre de sites actifs présents sur l'adsorbant ce qui entraîne une élution anticipée de l'analyte. La capacité peut être déterminée en calculant les rendements d'extraction de quantités de percolation croissantes. Ces rendements seront constants puis diminueront après saturation du support.

### **III.1.4 Mode de couplage**

L'extraction peut être totalement dissociée de l'analyse chromatographique, c'est ce qui est appelée l'extraction en différé. Elle peut être totalement intégrée au système chromatographique, ainsi appelée extraction en ligne.

### III.1.4.1 Extraction en différé

A la fin de l'extraction, l'éluat est recueilli et peut éventuellement être évaporé à des fins de concentration ou de changement de solvant. Après reprise dans une solution appropriée, une fraction de l'éluat est injectée dans le système chromatographique. Le principal avantage de cette méthode est qu'il n'existe pas de contraintes de compatibilité entre la nature de l'adsorbant et le système analytique utilisé. Seule la nature du solvant de redissolution de l'extrait doit être compatible avec le système chromatographique. De plus cette méthode est automatisable grâce à des robots permettant de réaliser chaque étape séquentiellement [150].

### III.1.4.2 Couplage en ligne de l'extraction avec l'analyse

Dans cette méthode, une précolonne de petite taille est installée à la place de la boucle sur une vanne d'injection classique (**Figure 11**). Après percolation de l'échantillon *via* une pompe ordinaire, la précolonne est couplée à la colonne analytique. Les composés retenus dans la précolonne sont alors élués et transférés en tête de colonne analytique par la phase mobile d'analyse en même temps qu'ils sont séparés. Un paramètre très important dans ce type d'extraction est la force éluante de la phase mobile utilisée pour la séparation analytique, puisqu'elle doit permettre un transfert rapide des solutés de la précolonne à la colonne analytique. Une des différences entre les deux modes de couplages réside dans la taille des particules. Dans le cas de l'extraction en différé, des particules de 40 à 150  $\mu\text{m}$  sont utilisées pour faciliter l'écoulement des échantillons et des solvants.

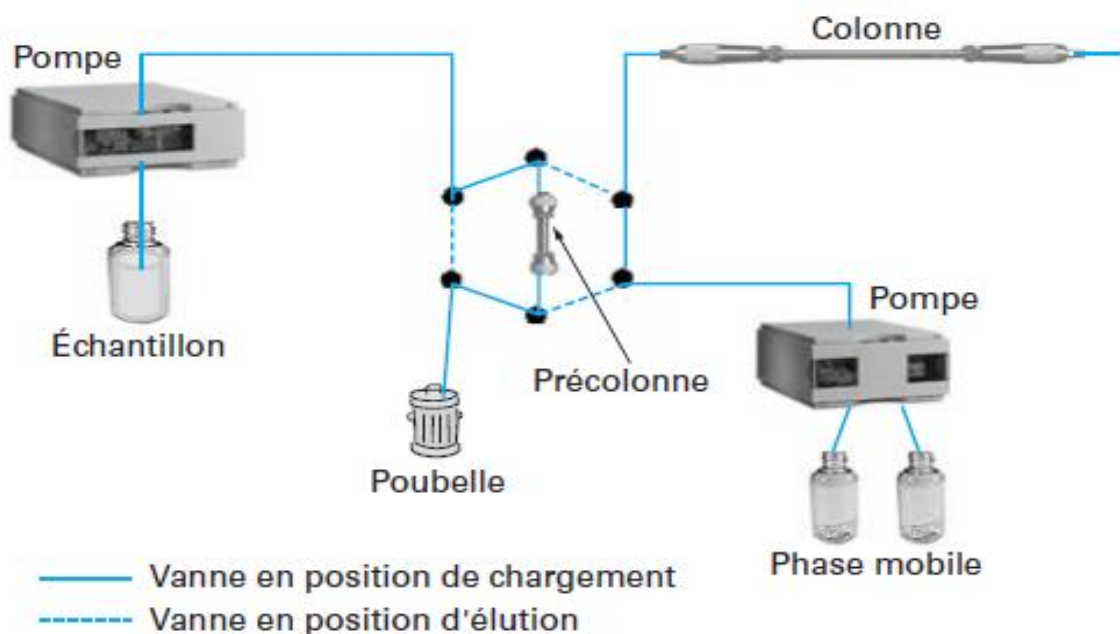


Figure 11: Description d'un système d'extraction en ligne [150].

### III.1.5 Présentation des supports conventionnels

Le choix de l'adsorbant dépend du volume de l'échantillon, de la nature des solutés à extraire et des mécanismes de rétention des solutés. Ainsi, les adsorbants peuvent être classés en fonction de la nature des interactions qu'ils développent avec les analytes.

#### III.1.5.1 Les adsorbants polaires

Il s'agit principalement des phases de silice, d'alumine, de *Florisil* (Silicate de magnésium) ou de phase de silice greffée par des motifs polaires tels que des fonctions diols, amines ou nitriles. Ces phases sont dédiées à l'extraction de molécules de milieux non polaires (huiles, produits pétroliers, cosmétiques...). L'élution est ensuite réalisée par percolation d'un solvant polaire capable de rompre les interactions développées (liaison hydrogène, interactions dipolaires...) [150]. L'analyse de l'OTA dans des denrées alimentaires peut être réalisée par une première étape d'extraction par solvant suivie d'une purification par SPE avec de la silice vierge [51].

#### III.1.5.2 Les adsorbants apolaires

Il s'agit principalement de la silice greffée n-alkyle (C8 ou C18) et de phases de polystyrène-divinylbenzène capables de développer des interactions hydrophobes et des

interactions électroniques de type  $\pi$ - $\pi$ . La rétention des solutés est gouvernée par des interactions hydrophobes, mais la présence de noyaux aromatiques sur l'adsorbant peut engendrer des interactions avec des solutés contenant des noyaux aromatiques. Ces deux types de supports présentent l'avantage de résister à la pression et d'être utilisés avec des solvants compatibles avec les phases mobiles de la chromatographie liquide de partage à phases inversées, ce qui permet leur utilisation dans un système en ligne. La silice C18 souffre cependant de quelques limitations. En effet, elle ne peut être utilisée qu'entre pH 2 et pH 8 alors que les polymères sont stables sur toute la gamme de pH (0-14). Néanmoins, la silice C18 reste de loin l'adsorbant le plus utilisé. Elle permet par exemple l'extraction de l'OTA du vin ou de la bière [151].

### **III.1.5.3 Les échangeurs d'ions**

Les échangeurs d'ions sont des supports de silice ou de polymères greffés par des groupements chargés de type acides/bases faibles ou forts ( $\text{COO}^-$ ,  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{NR}_3^+$ ,  $\text{NHR}_2^+$ ) ou par des groupements ionisés. La rétention maximale des solutés ionisables est obtenue en adaptant le pH de l'échantillon de façon à ce que le soluté soit ionisé et donc retenu par l'échangeur de charge opposée. Pour l'élution, un changement de pH permet le passage de ce soluté sous forme moléculaire qui n'est alors plus retenu par l'échangeur. Pour les solutés ionisés, quel que soit le pH, l'élution est réalisée par le passage d'ions ayant plus d'affinité que le soluté pour l'échangeur ou par des solutions de force ionique élevée.

### **III.1.5.4 Limitations des supports conventionnels**

L'extraction liquide-solide présente l'intérêt de permettre la récupération et la concentration de composés en une seule étape. Cependant, pour certaines matrices, beaucoup de composés sont coextraits et rendent l'analyse des composés étudiés difficile à cause de pics d'impuretés qui apparaissent dans le chromatogramme. Cette co-élution se manifeste par une amplification ou une diminution du signal. Ces interférences peuvent être limitées en utilisant des supports sélectifs ou à mode de rétention dual. Ils sont basés sur la contribution de deux mécanismes de rétention différents, permettant d'obtenir une meilleure purification par cette étape d'extraction. Des phases à accès restreint peuvent être également utilisées, ces phases combinent un mécanisme d'exclusion des molécules de masse moléculaire élevée et un mécanisme de partage permettant la rétention des petites molécules. Ainsi, de nombreuses phases ont été développées et récemment répertoriées [152]. Dans le but d'éliminer les

interférences, des supports adaptés aux hauts débits ont été développés en utilisant des particules de grande granulométrie. Les auteurs expliquent que les forces d'Eddy générées à hauts débits (flux quasi turbulent) permettent d'exclure les macromolécules qui diffusent mieux dans le milieu intraparticulaire sans obturer la colonne [153].

L'extraction sélective sur phase solide a donc pour objectif d'extraire uniquement le ou les analytes d'intérêt de l'échantillon complexe. Des supports plus sélectifs basés sur des mécanismes de reconnaissance moléculaire ont donc été développés. Ces supports sont basés sur l'utilisation d'un élément de reconnaissance qui peut être un anticorps, un polymère à empreinte moléculaire (MIP) ou un aptamère.

## **III.2 Les supports biologiques à reconnaissance moléculaire**

La plupart des supports préalablement évoqués conduisent à la coextraction de composés de polarité similaire à celle des analytes cibles. Des supports d'affinité basés sur l'utilisation d'éléments de reconnaissance spécifiques des analytes recherchés peuvent alors être utilisés pour l'extraction directe d'un composé ou d'une famille d'analogues structuraux d'échantillons aqueux ou pour la purification d'extraits issus du traitement d'échantillons solides.

### **III.2.1 Les colonnes d'immunoaffinité ou immunoadsorbants**

La grande sélectivité et la forte affinité de l'interaction antigène-anticorps peut être exploitée dans le développement de supports d'extraction permettant l'obtention d'extraits propres facilitant ainsi l'étape d'analyse.

#### **III.2.1.1 Les anticorps**

Les anticorps ont été utilisés pour la première fois comme agents immunitaires en chimie en 1907 après le livre publié par Arrhenius «Immunochemistry: The Application of the Principles of Physical Chemistry to the Study of Biological Antibodies». L'auteur a expliqué les divers phénomènes *in vitro* et *in vivo* en relation avec la formation du complexe antigène-anticorps [154]. Les anticorps sont des glycoprotéines secrétées par les lymphocytes B, en

réponse à un agent étranger ou antigène. Un anticorps consiste à deux chaînes polypeptidiques identiques lourdes (50 à 65 KDa) et deux chaînes légères (25 KDa), elles sont connectées par des ponts disulfures et des interactions non-covalentes. Le site de liaison de l'antigène, appelé fragment Fab consiste en une chaîne légère et les deux domaines N-terminal connectés par des ponts disulfures. Ils sont produits par immunisation animale. Un composé représentatif de la famille cible est sélectionné, l'antigène, qui sera pris comme modèle pour produire les anticorps. Cet analyte doit souvent être chimiquement modifié afin d'introduire une fonction qui permettra son greffage à une protéine porteuse. Plusieurs molécules modifiées, appelées haptènes, seront couplées à une protéine. Cette entité immunogène, appelée immunoconjugué, est ensuite utilisée pour immuniser un animal comme la souris ou le lapin. Quelques millilitres de sérum sont ensuite prélevés de l'animal après quelques semaines d'immunisation. Une purification est mise en œuvre pour isoler les anticorps (immunoglobulines de type G, IgG) [155]. La qualité d'une préparation d'anticorps pour des fins de dosages ou d'identification repose sur deux facteurs principaux, la spécificité et l'affinité.

Deux types d'anticorps avec différents degrés de spécificité peuvent être obtenus. Les anticorps polyclonaux sont dirigés vers différents sites de fixation sur l'antigène avec différentes affinités. Les anticorps monoclonaux sont spécifiques d'un seul épitope de l'antigène et possèdent une affinité uniforme. Les anticorps monoclonaux sont plus utilisables dans les immunoessais malgré leur coût plus élevé.

Les propriétés des anticorps sont exploitées dans la conception de nombreux bioessais. Ces outils analytiques présentent l'avantage d'être utilisables *in vitro* et sont généralement dotés d'une grande sensibilité. Ils sont très souvent utilisés de manière complémentaire aux analyses chromatographiques.

### **III.2.1.2 Les immunoadsorbants**

Le principe des immunoadsorbants est relativement simple, l'anticorps spécifique de la molécule d'intérêt est immobilisé de façon covalente sur un support solide hydrophile (silice activée, gel d'agarose ou de sépharose...). Généralement, 0,2 à 0,5 mL de gel sont conditionnés entre deux frittés dans une cartouche ou une précolonne (**Figure 12**). Les immunoadsorbants ainsi produits peuvent être utilisés comme tout support classique d'extraction. L'immunoextraction consiste donc à percoler un échantillon sur le support.

Après cette étape suivie généralement d'une étape de lavage, seuls les composés reconnus par l'anticorps seront retenus sur le support. Les interactions antigène-anticorps sont par la suite rompues pendant l'étape d'éluion afin de récupérer un extrait contenant uniquement les molécules d'intérêt.

Les immunoabsorbants sont basés sur la reconnaissance moléculaire entre l'analyte et son anticorps spécifique. L'affinité de cette réaction joue un rôle très important, elle dépend fortement des propriétés de l'anticorps mis en jeu. En plus des interactions spécifiques des anticorps avec l'antigène contre lequel ils ont été synthétisés, ils sont aussi source de réactions croisées, c'est-à-dire de réactions avec les analogues structuraux de l'antigène. Il existe une forte relation entre les rendements d'extraction et la quantité d'anticorps disponible. Le

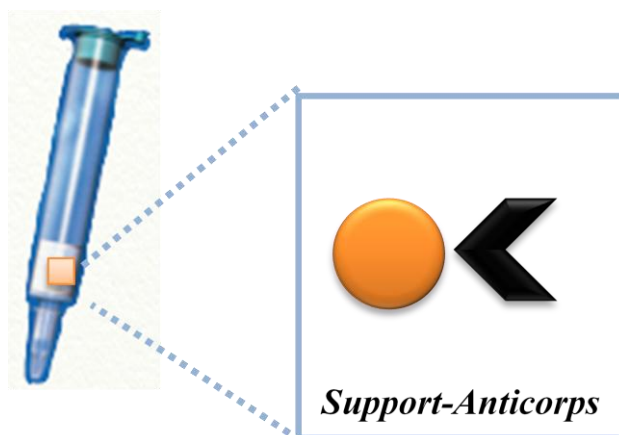


Figure 12: Représentation schématique d'une colonne d'immunoaffinité. Elle contient une phase d'extraction solide fabriquée d'un support modifié avec un anticorps spécifique de l'analyte).

nombre ou la quantité d'anticorps immobilisés sur l'adsorbant, souvent exprimée en mg/g d'adsorbant, ainsi que le degré de purification des anticorps sont des paramètres clés car ils déterminent la capacité de fixation de l'immunoabsorbant.

Récemment, plusieurs études ont porté sur le développement de colonnes d'immunoaffinité pour la détection des pesticides, des micropolluants organiques et les mycotoxines, principalement pour des analyses environnementales et alimentaires [156].

### **III.2.1.3 Limitations des immunoabsorbants**

Le principal inconvénient des immunoabsorbants est la réactivité croisée. Les anticorps peuvent se lier à un ou deux composés ayant une structure proche de la molécule

cible. De plus, l'échantillon doit être dissous, en général, dans une solution aqueuse, car les solvants organiques dénaturent l'anticorps et peuvent interférer avec l'interaction antigène-anticorps ce qui peut être une limitation dans le cas d'extraction de composés non polaires [157]. D'un autre côté, malgré la spécificité des anticorps vis-à-vis de leurs cibles, des interactions non-spécifiques avec le support d'immobilisation peuvent également avoir lieu. Cela signifie, dans les cas des matrices complexes, que l'éluat obtenu n'est pas aussi pur que prévu [158]. Cela est observé principalement dans le cas des supports hydrophiles qui offrent une immobilisation orientée, quelques interactions hydrophobes non-spécifiques, principalement de type  $\pi$ - $\pi$ , peuvent se produire entre la matrice et les analytes affectant la sélectivité de la méthode [159]. Du point de vue stabilité et réutilisabilité, les immunoadsorbants sont difficiles à régénérer, à cause de la nature protéique des anticorps et de leur production impliquant l'immunisation animale *in vivo* et dont l'activité peut diminuer après chaque utilisation. Enfin, ce type de support reste néanmoins relativement onéreux puisque le prix d'une colonne est compris entre 10 et 15 euros.

#### **III.2.1.4 Extraction de l'OTA par des IACs**

L'immuno-extraction était la méthode la plus efficace pour la purification des matrices complexes comme le café, bière et vin qui peuvent être directement percolées dans la colonne d'immunoaffinité. Basées sur le principe de l'immunoextraction, plusieurs IACs commerciales ont été développées pour l'extraction de l'OTA à partir de différentes matrices alimentaires.



Tableau 4: les IACs commerciales pour l'extraction de l'OTA [44]

Compagnie	Nom du produit	Analyse chromatographique
LC Tech (Allemagne)	OtaCLEANTM	CLHP-FLD ou LC-MS
Libios (France)	Puri-Fast OTA IAC	CLHP
R-biopharm AG (Allemagne)	OchraprepTM	CLHP
	Rida Ochratoxin A	CLHP ou ELISA
Romer Labs (Australie)	OchrastarTM	CLHP
	OchrastarTMFIT	CLHP
Vicam science (U.S.A)	OchraTestTM	Fluorimètre ou CLHP
	OchraTestTMWB	CLHP, CLUP ou LC/MS/MS

Les immunoabsorbants ont été utilisés comme outils d'extraction et de purification de l'OTA dans de nombreuses méthodes d'analyse. Visconti *et al* ont décrit une méthode de détermination de l'OTA dans trois types de vin (blanc, rosé et rouge) par CLHP précédée par une étape de purification en utilisant des IACs de Vicam science. La limite de détection obtenue était de 0,01 ng/mL et les rendements d'extraction variaient de 88 à 103% [160]. La même méthode a été utilisée par Prado *et al* pour la détermination de l'OTA dans des échantillons de bière où la limite de détection obtenue était de 2 pg/mL avec un rendement d'extraction variant de 81,2 à 95% [161]. Reiter *et al* ont décrit un autre type de colonnes d'immunoaffinité basées sur la méthode sol-gel pour extraire l'OTA à partir des céréales contaminées, l'extrait était ensuite analysé par CLHP. Les résultats obtenus étaient comparables à ceux obtenus par les colonnes conventionnelles où les rendements d'extraction étaient de 82±5%, 90±6% et 91±3% respectivement pour le blé, l'orge et le seigle, avec une limite de détection de 0,5 µg/Kg [162]. L'immunoextraction a également été appliquée sur des échantillons d'origine animale comme le lait de vache en utilisant des IACs commerciales de VicamTestTM, la LOD obtenue était de 0,5 ng/mL avec un rendement d'extraction de 89,8±5,8% [163]. Très récemment un groupe de chercheurs a décrit une nouvelle méthode de détermination de l'OTA dans les muscles du porc. Dans cette méthode, les IACs ont été utilisées comme outil de purification et la LC-ESI-MS<sup>2</sup> comme outil de détection. La LOD obtenue était de 0,19 µg/Kg et le rendement d'extraction variaient de 98,5 à 100,6% [164]. Enfin, des échantillons prélevés du corps humain ont été aussi visés par l'immunoextraction

de l'OTA. Ueno *et al* ont étudié la présence de l'OTA dans le plasma de 184 personnes en bonne santé à Tokyo par CLHP précédée d'une purification par des IACs. 85% des cas étaient positifs et la moyenne était de 68 pg/mL [165]. Pascale *et al* ont décrit une méthode d'immunoextraction et de détection de l'OTA dans l'urine humaine, les rendements d'extraction obtenus étaient entre 88 et 93% et la LOD était de 0,005 ng/mL. 61% des cas étudiés étaient positifs avec seulement un échantillon excédant 0,05 ng/mL appartenant à un patient atteint d'une néphrite [166].

### III.2.2 Les polymères à empreintes moléculaires (MIPs)

Dans le but de remplacer les anticorps par des homologues synthétiques, les MIPs ont été proposés. La technique de l'impression moléculaire est une nouvelle méthode de préparation de polymères accepteurs sélectifs pour une molécule cible donnée. Ces polymères sont appelés polymères à empreintes moléculaires, ils sont utilisés comme molécules de reconnaissance dans différents domaines. Les MIPs sont des polymères synthétiques spécifiques pour leurs molécules cibles. Lors de leur préparation, les monomères forment un complexe avec la molécule cible appelée «template» par des interactions covalentes ou non-covalentes en présence d'un agent réticulant, formant ainsi des cavités (**Figure 13**). Une fois la polymérisation terminée, la molécule template est éliminée par extraction ou par une réaction chimique afin de rendre disponibles les sites de liaison complémentaires à la cible en forme, taille et position des groupes fonctionnels, permettant ainsi son adsorption sélective [149].

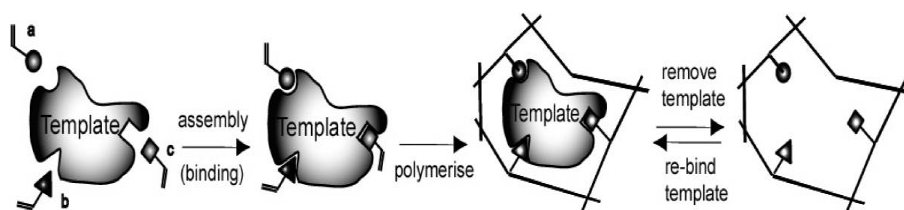


Figure 13: Les différentes étapes de l'impression moléculaire [167].

Template=modèle, assembly=assemblage, remove template=élimination du modèle, re-bind template=relire le modèle.

La rétention est basée sur une reconnaissance structurale et fonctionnelle d'une ou de plusieurs molécules. Comme pour les anticorps, la rétention peut être basée sur un mélange

d'interactions hydrophobes, électroniques ou de type liaisons hydrogène. La nature des interactions est définie par la nature des monomères et du solvant de polymérisation utilisé pour la synthèse, ce qui implique de développer des procédures d'extraction dans un solvant proche de celui-ci.

La première application des MIPs dans l'extraction sur phase solide a été décrite par Sellergren pour l'extraction de pentamidine de l'urine [168]. Depuis, plusieurs méthodes SPE utilisant les MIPs ont été décrits. En 2004, Zhou *et al* ont décrit la première utilisation des MIPs dans l'extraction de l'OTA des échantillons alimentaires. Les MIPs ont été synthétisés à partir de N-phenylacrylamide et conditionnés dans une micro-colonne pour l'extraction sélective de l'OTA du blé. La fixation et l'élution de l'OTA ont été réalisées avec une LOD de 0,5 ng/mL et un rendement d'extraction de  $103 \pm 3\%$  [169]. Les MIPs ont été aussi préparés avec du pyrrole comme monomère fonctionnel en présence de nanotubes de carbone afin d'améliorer la capacité de fixation. Avec une LOD de 0,08 ng/mL pour un temps d'analyse total de 30 minutes pour un échantillon de vin rouge, les performances de cette méthode sont comparables à la micro-extraction en phase solide [170]. Un protocole de purification SPE bidimensionnelle sur la silice C18 et en utilisant des MIPs sélectifs pour l'OTA a été décrit. Cette méthode alternative a été testée sur des échantillons de vin rouge enrichis (0,033-1 ng OTA/mL) et d'autres échantillons de vin commerciaux. Les rendements obtenus étaient supérieurs à 90% et les LOD étaient de 0,01 ng/mL et 0,033 ng/mL [171]. La technique des MIPs a été également comparée aux IAC pour la purification et la préconcentration de l'OTA, celle-ci a été décrite par Ali *et al* pour la purification d'échantillons de blé. La méthode développée et validée a montré une bonne linéarité et précision [172]. De plus, à la différence des immunoabsorbants, les MIPs sont stables et donc réutilisables aussitôt après le passage d'un solvant adapté afin de reconditionner le support. La synthèse des MIP est rapide et peu onéreuse si la molécule modèle est disponible à faible coût.

La principale limitation des MIPs est le phénomène de relargage. En effet, lors de l'utilisation du support, on peut observer une libération tardive de la molécule empreinte, ce qui peut fausser les résultats par surestimation de la quantité de molécule cible détectée. Ce phénomène provient du fait que l'élimination de la molécule empreinte après polymérisation peut être difficile.

### III.2.3 Les oligoadsorbants

En comparaison avec les éléments de reconnaissance couramment utilisés en extraction sur phase solide, les aptamères possèdent une meilleure stabilité et une durée de vie plus longue. La stabilité est un facteur clé dans l'extraction où des conditions d'élution rigoureuses sont utilisées. Grâce à la chimie des oligonucléotides, les aptamères sont facilement modifiés par des groupements fonctionnels permettant leur immobilisation sur les supports solides. Vu la taille des aptamères par rapport à celle des anticorps, la densité des aptamères immobilisés sur un support peut être plus importante, améliorant ainsi la capacité de rétention. En outre, les paramètres de la cinétique de liaison peuvent être considérés lors de la sélection de l'aptamère. Le processus de sélection peut être réalisé dans des conditions bien étudiées (par ex: pH, température, force ionique). Cet avantage unique permet une élution facile des cibles retenues en chromatographie d'affinité en changeant les conditions de pH, température ou de force ionique [173].

Vus les avantages des aptamères, ces ligands prometteurs ont été récemment utilisés dans de nombreuses méthodes d'extraction de petites et macromolécules. La première utilisation des aptamères dans une colonne d'affinité a été décrite par Romig *et al* pour la purification de la protéine recombinante humaine L-sélectine-Ig à partir d'un milieu conditionné de cellules ovariennes d'hamster chinois. Le support d'immobilisation utilisé est le sépharose activé par la streptavidine sur lequel sont fixés des aptamères biotinylés. Les résultats obtenus ont montré l'applicabilité des aptamères comme outils d'extraction [174]. Après l'application réussie sur des protéines, Mc Grown et son équipe ont publié pour la première fois l'utilisation d'aptamères ADNs comme phase stationnaire pour la séparation de petits solutés [175].

Récemment, après la sélection de l'aptamère spécifique de l'OTA par Cruz-Aguado et Penner [119], le même groupe a décrit le développement du premier support d'extraction de l'OTA à base d'aptamère. L'aptamère a été immobilisé par liaison covalente sur un support d'agarose pour développer une colonne d'affinité afin d'extraire l'OTA des échantillons de blé [176]. La concentration de l'OTA a été déterminée par polarisation de fluorescence avec une limite de détection de 2 ng/mL. Malgré l'originalité de la méthode, la limite de détection atteinte est proche des quantités limites d'OTA fixées par la commission européenne. Le même protocole a été repris et amélioré par De Girolamo *et al* afin de prouver l'applicabilité

des colonnes SPE à base d'aptamères dans l'analyse CLHP-FLD de différents échantillons de blé contaminés par l'OTA. Les rendements d'extraction d'OTA à partir des échantillons de blé enrichis par 0,5 à 50 ng/g variaient de 74 à 88% avec des limites de détection et de quantification de 23 et 77 pg/g, respectivement. Une comparaison des performances des oligoadsorbants développés avec des colonnes d'immunoaffinité a été réalisée et une bonne corrélation de 0,999 a été obtenue. Enfin, la réutilisabilité des colonnes a été testée et les auteurs ont montré que les oligoadsorbants peuvent être utilisés jusqu'à 5 fois sans perte de performance. Cependant, les rendements d'extraction obtenus ne permettent pas l'extraction totale de l'OTA dans l'échantillon [177]. Dans le cadre de cette thèse un oligoadsorbant pour l'extraction de l'OTA a été mis au point et appliqué à des échantillons de bière. Cette partie sera détaillée dans le prochain chapitre. Un autre type d'oligoadsorbant a été développé récemment en immobilisant l'aptamère spécifique de l'OTA sur des billes magnétiques. La concentration d'OTA dans l'extrait a été détectée par CLHP-FLD. L'efficacité des colonnes a été comparée avec celle d'une cartouche C18 commerciale. La méthode a été appliquée sur des échantillons enrichis à différentes concentrations d'OTA (de 2,5 à 50 ng/g) avec des rendements d'extraction variant entre 67 et 90% [178].

## **IV. Méthodes biochimiques pour l'analyse de l'OTA dans les aliments**

A cause de son faible poids moléculaire (403,8g/mole) et des faibles quantités dans les aliments, l'OTA doit être détectée par des méthodes très sensibles et précises. Les méthodes analytiques classiques comme la spectroscopie de masse et la chromatographie sont des méthodes performantes. Cependant, elles demandent une étape de préparation des échantillons qui demande beaucoup de temps et un matériel sophistiqué, de plus, ces méthodes doivent être réalisées dans un laboratoire. Récemment, des méthodes de détection biochimiques émergent et présentent une bonne alternative aux méthodes analytiques classiques, car elles sont plus sensibles, moins coûteuses, simples, et ne nécessitent ni un grand appareillage ni un personnel qualifié.

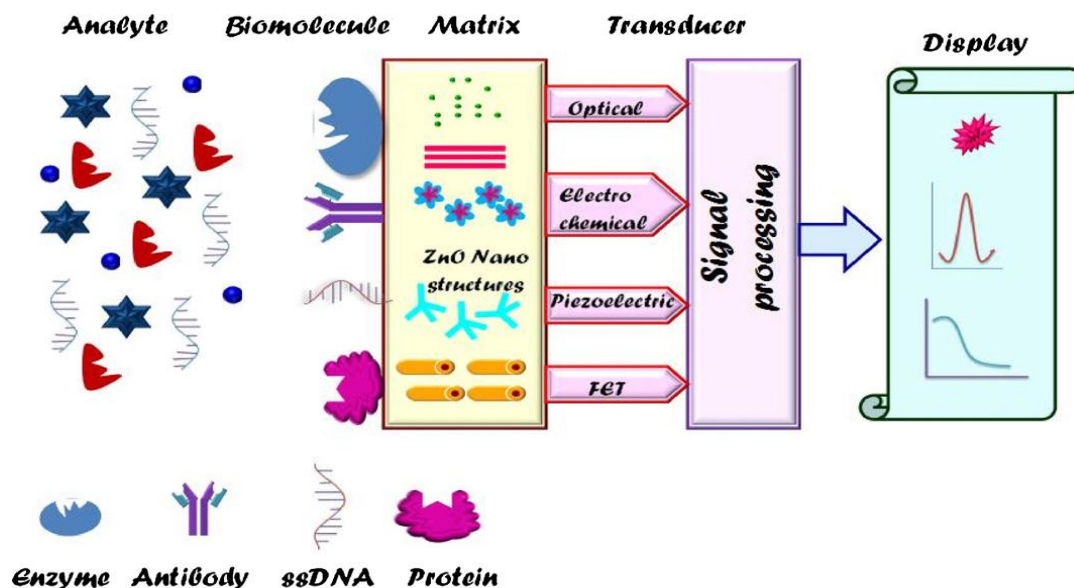


Figure 14: Principe général d'un biocapteur [179].

Matrix=matrice, transducer=transducteur, display=mesure, signal processing=traitement de signal, antibody=anticorps.

Les méthodes biochimiques sont basées sur l'incorporation d'un récepteur biologique comme élément de reconnaissance ou biorécepteur et un transducteur qui convertit la réaction biologique en un signal mesurable. On utilise dans ce travail les biocapteurs comme méthode biochimique. Le principe d'un biocapteur est montré dans la **Figure 14**.

Les éléments de reconnaissance généralement utilisés dans les méthodes bioanalytiques de détection et quantification de l'OTA sont les anticorps et les aptamères.

## IV.1 Les méthodes d'immobilisation des biomolécules

L'étape de l'immobilisation de l'élément de reconnaissance ou de sa cible sur le support de transduction est une étape cruciale dans l'optimisation de la performance analytique d'un bioessai en termes de réponse, sensibilité, stabilité et réutilisabilité. La quantité de biomolécule immobilisée joue un rôle très important dans la sensibilité et elle doit être bien contrôlée. L'orientation de la molécule est aléatoire ce qui peut réduire le nombre de sites de fixation de l'analyte par encombrement stérique. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour immobiliser un anticorps, un aptamère ou un antigène dans une méthode biochimique.

Tableau 5: les différentes méthodes d'immobilisation des biomolécules

Méthode d'immobilisation	Description de la méthode	Avantages et limitations
Adsorption physique	Interactions électrostatiques Van Der Waals  Liaisons hydrogènes	+Rapide et simple  -Orientation aléatoire et faible fixation
Couplage covalent	Liaison covalente entre les groupements fonctionnels de l'Ac/Ag et le support	+Stabilité  +Rendement élevé  -Orientation aléatoire
Réticulation	Liaison chimique en utilisant des réactifs bi fonctionnels (ex : glutaraldéhyde)	+Améliorer la stabilité de la molécule immobilisée  -Le biomatériau peut être inactif

## IV.2 Les différents modes de transduction

Le choix du transducteur dépend des changements physico-chimiques de la réaction biochimique. Ce choix est lié à la sensibilité, la rapidité, l'efficacité et la simplicité du bioessai. La plupart des types de transducteurs sont classés de la manière suivante:

- La transduction optique utilise des fibres optiques qui dirigent une lumière vers le film de détection. Les méthodes de détection optiques sont fondées sur la mesure de la lumière absorbée ou émise lors d'une réaction biochimique. Ces méthodes peuvent employer une détection colorimétrique, la fluorescence, la résonance des plasmons de surface (SPR), la bioluminescence...etc.
- La transduction piézoélectrique convertit la réaction biochimique en un signal mesurable tel que les changements de fréquence de résonance. Le principe est basé sur les propriétés piézoélectriques du matériau utilisé, Le biocapteur piézoélectrique le plus utilisé est la microbalance à quartz (QCM).
- La transduction calorimétrique est basée sur la mesure de la chaleur de la réaction biochimique sur l'élément de détection.

- La transduction électrochimique: Les biocapteurs électrochimiques sont des outils capables de fournir des informations analytiques spécifiques, quantitatives ou semi-quantitatives, à l'aide de transducteurs électrochimiques. Lors d'interactions biologiques et chimiques entre une substance biologique active et son substrat, une ou des espèces électroactives est consommée et/ou générée. Durant ce procédé, un détecteur électrochimique mesure le signal électrochimique produit par les interactions. Ces biocapteurs sont intéressants en raison de leur capacité de miniaturisation, leur simplicité, leur faible coût et leur rapidité de réponse. Ils fonctionnent avec des systèmes de détection différents, comme la conductimétrie (variation de la capacité d'un matériau à transporter des charges), la potentiométrie (variation de voltage mesuré entre les électrodes), l'impédimétrie (variation du champs électrique d'une interface soumise à une faible tension alternative à différentes fréquences) et l'ampérométrie (variation du courant mesuré à un voltage appliqué donné) [180, 181].

Le mode de transduction utilisé dans ce travail de thèse est électrochimique avec une détection ampérométrique.

### *Les biocapteurs ampérométriques*

Les capteurs voltamétriques étudient l'effet de la concentration de l'analyte sur les caractéristiques du potentiel d'oxydation ou de réduction d'une réaction spécifique. Les capteurs ampérométriques constituent une sous classe des capteurs voltamétriques. Les biocapteurs ampérométriques mesurent des variations de courant à l'électrode de travail provenant de l'oxydoréduction à potentiel constant d'espèces électroactives produites lors d'une réaction biochimique directe ou indirecte (**Figure 15**). Le système fondamental de mesure utilise trois électrodes: une électrode de travail où la réaction aura lieu, une électrode de référence régissant la valeur du potentiel appliqué sur l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire ou contre électrode qui transporte le courant de l'électrode de référence. Les électrodes généralement utilisées sont construites des matériaux conducteurs (or, platine, graphite, pâte de carbone, les nanotubes de carbone, carbone vitreux).



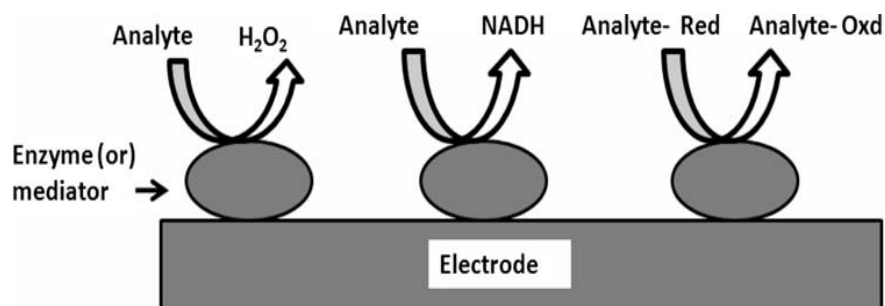


Figure 15: Les différents types de biocapteurs ampérométriques [182].

## IV.3 Les méthodes immunochimiques

### IV.3.1 Principe

Les techniques immunochimiques sont les techniques les plus utilisées dans les mesures quantitatives car elles peuvent être appliquées sur une large gamme de concentrations, dans plusieurs matrices alimentaires et dans différents formats. Les immunoessais sont basés sur la forte interaction entre la toxine ou l'antigène et son anticorps spécifique. Ces méthodes sont basées sur une réaction de liaison compétitive ou non-compétitive entre la cible présente dans l'échantillon et les sites de fixation spécifiques de l'anticorps. Après incubation de l'analyte avec l'anticorps, un complexe immun est formé. L'analyse est réalisée en mesurant le changement des propriétés physiques ou chimiques sur la surface du transducteur. Une courbe de calibration standard est ensuite tracée en fonction de la concentration de l'analyte dans l'échantillon. Selon le type de marquage, on distingue les radioimmunoessais (RIA), les immunoessais fluorescents (FIA), les immunoessais chimiluminescents (CIA) et les immunoessais enzymatiques (EIA).

Les paramètres clés d'un immunoessai sont (1) un bon ratio signal/bruit de fond qui donne la meilleure sensibilité, (2) une bonne reproductibilité et (3) une possibilité de détecter la cible dans une large gamme de concentrations et dans différentes matrices.

La méthode ELISA était le premier immunoessai développé pour la quantification de l'OTA [183]. Cette méthode est basée sur l'immobilisation de l'anticorps ou l'antigène sur une phase solide, généralement, les puits d'une microplaque, suivie par une étape de compétition entre l'OTA libre présente dans l'échantillon à analyser et l'OTA marquée avec une enzyme. La phase solide facilite les étapes de lavage et de séparation qui permettent de distinguer les fractions libres des fractions liées. Dans un test ELISA compétitif direct, les 96 puits de la

microplaque sont tapissés avec l'anticorps. Après les étapes de blocage, compétition et lavages, le substrat de l'enzyme est ajouté et l'absorbance est mesurée. Tandis que dans un test indirect, l'OTA conjugué avec la BSA (Bovin Serum Albumin) est adsorbé sur les puits. La compétition aura lieu, après une étape de blocage, entre l'OTA immobilisé et l'OTA présente dans l'échantillon pour se fixer sur l'anticorps marqué.

Depuis, plusieurs formats ELISA ont été décrits pour l'analyse de l'OTA dans la viande de poulet et le blé [183], le café [184], le maïs [185], les céréales [186] et le vin [187]. La nécessité de tests rapides standardisés a augmenté la demande des kits commerciaux automatisés faciles à utiliser. Plusieurs entreprises ont développé et commercialisé des kits de microplaques ELISA dont l'applicabilité, la gamme analytique et les critères de validation sont bien définis. Certains d'entre eux sont bien adaptés à la détermination de l'OTA dans les céréales, les fruits secs, le café, le cacao, le thé, la bière, le vin et les raisins [188]. Malgré la sensibilité des tests ELISA, ces méthodes restent dépendantes des méthodes classiques, car la possibilité des résultats faux positifs et négatifs implique un test de confirmation par chromatographie liquide. D'un autre côté, les différentes étapes d'un test ELISA tels que l'incubation, le lavage et le blocage peuvent prendre beaucoup de temps qui peut varier de 30 min à 3 heures.

## **IV.3.2 Les différents formats utilisés**

### **IV.3.2.1 Les tests non compétitifs de type «sandwich»**

Dans ce cas, deux anticorps sont utilisés et l'antigène est capturé entre les deux d'où le nom de «sandwich». Dans le format sandwich direct, l'anticorps primaire spécifique de la cible est immobilisé sur la surface, il est ensuite incubé avec l'antigène. Un anticorps secondaire marqué reconnaissant un autre épitope sur l'antigène est ensuite lié à l'antigène. Le marquage de cet anticorps secondaire permet la détermination de l'analyte où le signal obtenu est directement proportionnel à la quantité de l'antigène. Dans le format sandwich indirect, l'antigène est immobilisé sur la surface, l'anticorps primaire forme ensuite un sandwich avec l'anticorps secondaire anti-IgG marqué. Et comme dans le test direct, le signal obtenu est proportionnel à la quantité de l'analyte (**Figure 16**). Ce type de test immunochimique est adapté aux macromolécules comme les protéines et les anticorps [189, 190]. Vu la petite taille de l'OTA, sa détermination par des immunoessais en sandwich est impossible.

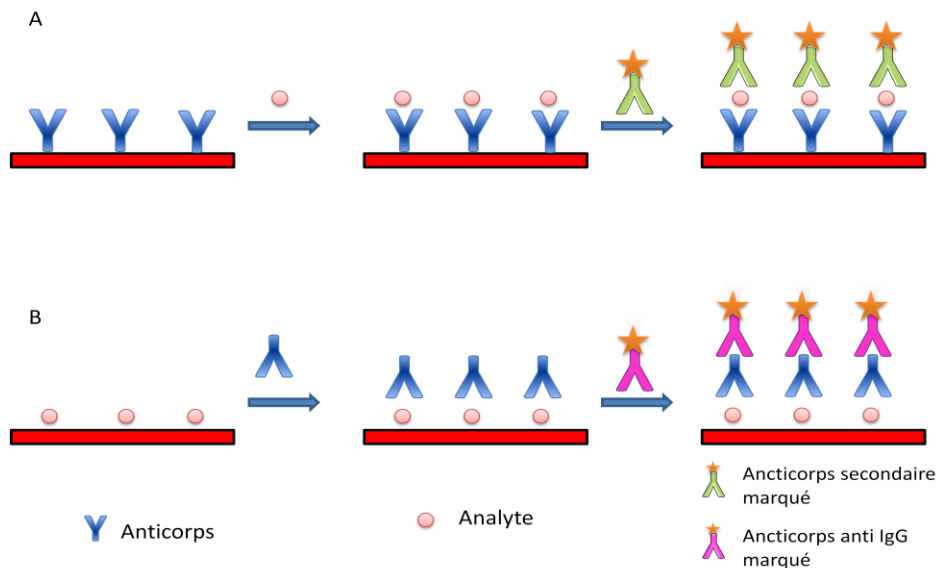


Figure 16: Les immunoessais non-compétitifs direct (A) et indirect (B).

### IV.3.2.2 Les tests compétitifs

Dans les immunoessais basés sur la compétition, un seul anticorps est utilisé vue la petite taille des molécules cibles. Le principe de ces méthodes est basé sur la compétition entre la cible libre et la cible ou l'anticorps marqué. Une quantité connue de l'antigène marqué est utilisée pour permettre la détection de la quantité variable de l'antigène libre. La concentration de la cible est inversement proportionnelle au signal obtenu. La compétition peut être réalisée dans un format compétitif direct ou indirect. Dans le format direct, l'anticorps spécifique de la cible est immobilisé sur la surface et l'analyte libre présent dans l'échantillon entre en compétition avec l'analyte marqué, dont la concentration est bien définie. Dans le format indirect, l'antigène est immobilisé sur la surface suivi par l'injection du mélange de l'antigène libre et l'anticorps primaire marqué. La compétition joue donc entre l'antigène immobilisé dont la concentration est connue et l'antigène libre présent dans l'échantillon dont la concentration est à mesurer. S'il est difficile de marquer l'anticorps primaire, un autre anticorps secondaire marqué est utilisé et va réagir avec l'anticorps primaire. Le signal obtenu est inversement proportionnel à la quantité de la cible dans l'échantillon (**Figure 17**). Plusieurs immunoessais compétitifs ont été décrits pour la détermination de l'OTA [191, 192].

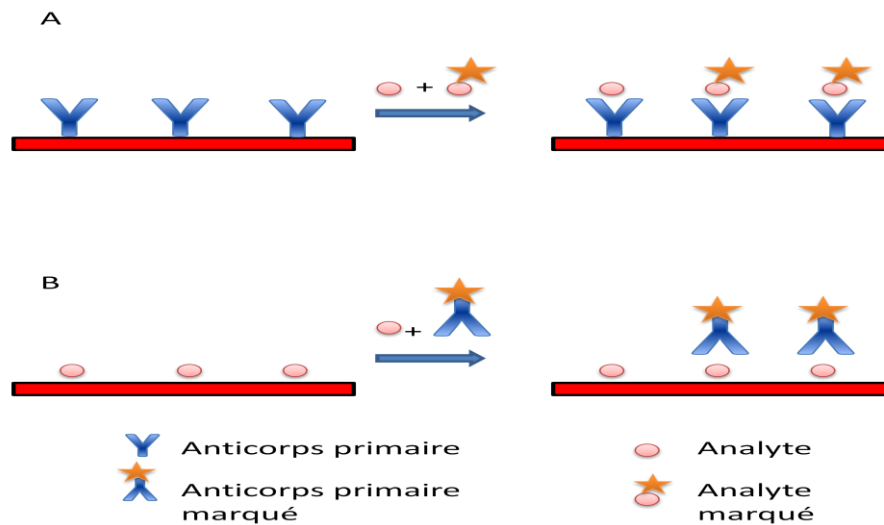
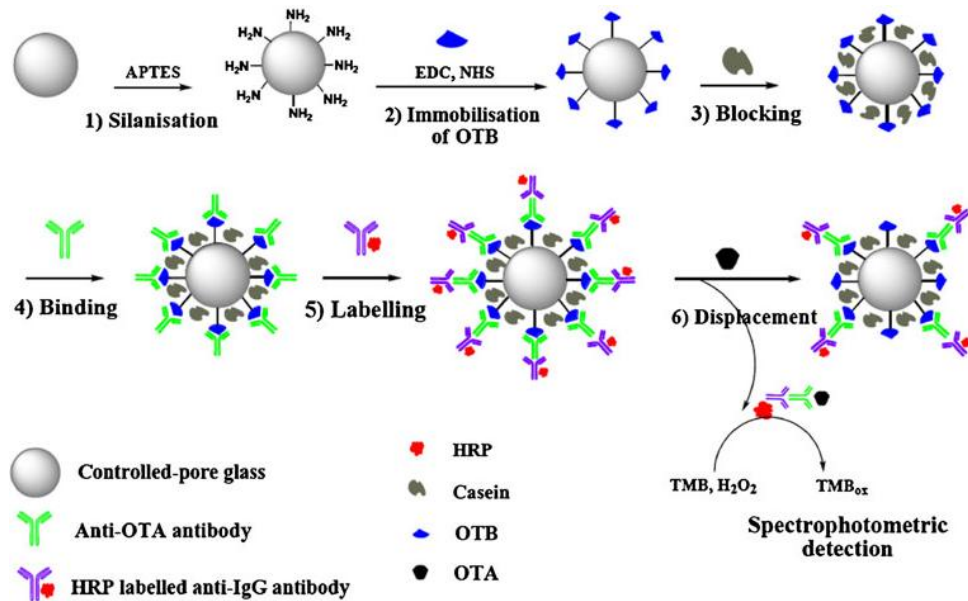


Figure 17: Les immunoessais compétitifs direct (A) et indirect (B).

#### IV.3.2.3 Les immunoessais basés sur un système de déplacement

Le principe du déplacement consiste à immobiliser l'anticorps ou l'antigène sur la surface suivi par l'injection d'un élément marqué (antigène ou anticorps). Après saturation des sites de fixation de l'antigène par l'anticorps marqué, l'échantillon contenant l'antigène libre est ajouté, ce qui va entraîner la libération de l'élément marqué. Le signal obtenu est proportionnel à la quantité de cible dans l'échantillon. On distingue trois types de déplacements. (1) l'anticorps est immobilisé sur la surface et est incubé avec un antigène marqué, le flux de l'échantillon contenant la cible entraîne la libération de l'antigène marqué qui est moins affiné qui sera remplacé par l'antigène libre qui possède une meilleure affinité pour l'anticorps. (2) Un antigène, pour lequel l'anticorps est moins affiné (réactivité croisée), est immobilisé sur le support et est incubé avec l'anticorps primaire marqué. L'injection de l'échantillon contenant la cible possédant la meilleure affinité, entraîne le déplacement d'une certaine quantité de l'anticorps primaire marqué. Cette technique a été utilisée pour la détermination de l'OTA en utilisant l'OTB qui possède une faible affinité pour l'anticorps de l'OTA et la concentration de l'OTA était proportionnelle au signal obtenu [193]. (3) Dans un troisième cas, un complexe sandwich est formé entre l'anticorps primaire, un antigène avec une faible affinité et un anticorps secondaire marqué et est immobilisé sur un support. Le flux de l'échantillon déplace une certaine quantité de l'anticorps secondaire marqué.



**Figure 18:** Développement d'un immunoessai par déplacement en utilisant des billes modifiées-OTB pour la détection de l'OTA [193].

Blocking=blocage, binding=fixation, labelling=marquage, displacement=déplacement, controlled-pore glass=pore vitreux contrôlé, HRP labelled anti-IgG antibody=anticorps anti-IgG marqué à la HRP.

#### IV.3.2.4 Les immunoessais sans marquage

Parmi les différentes méthodes de transduction, les techniques électrochimiques, souvent très sensibles, sont couramment utilisées. Le principe est d'immobiliser l'anticorps sur une électrode et de convertir la réaction Ag-Ac en un signal électrique. Ce changement des propriétés de la surface est directement proportionnel au complexe anticorps-antigène qui dépend de la concentration de la cible dans l'échantillon. Certains auteurs ont décrit le développement d'immunocapteurs sans marquage pour la détermination de l'OTA [194, 195].

### IV.3.3 Les différents immunocapteurs rapportés dans la littérature pour la détermination de l'OTA

Plusieurs méthodes ont été décrites pour la détection de l'OTA dans les matrices alimentaires. Les immunocapteurs se présentent comme alternative à la méthode traditionnelle ELISA.

### **IV.3.3.1 Les immunocapteurs électrochimiques liés à un marquage enzymatique**

Parmi les différentes méthodes de transduction, les techniques électrochimiques sont couramment utilisées à cause de leur sensibilité. Le principe est de coupler l'anticorps avec une électrode de transduction qui va convertir la réaction Ag-Ac en un signal électrique. Le premier immunocapteur développé pour la détection de l'OTA était basé sur un format compétitif direct et lié à un marquage enzymatique. Un anticorps polyclonal spécifique de l'OTA était immobilisé sur une électrode de carbone. La voltamétrie différentielle d'impulsion était la méthode électrochimique utilisée pour la détection de l'OTA et l'immunocapteur était appliqué sur des échantillons de blé [196]. Plusieurs autres immunocapteurs électrochimiques basés sur des électrodes en carbone ont été développés pour la détection de l'OTA dans différentes matrices alimentaires telles que le vin [197] et le blé [198, 199]. Des électrodes en or modifiées avec une monocouche auto-assemblée de sel de diazonium ou de dextrane carboxyméthylé ont été utilisés pour la détection de l'OTA dans des échantillons de maïs et de vin [200-202]. Récemment, les billes magnétiques ont été employées comme support d'immobilisation des anticorps dans le développement d'un immunocapteur électrochimique pour la détection de l'OTA. Cet immunocapteur montre une meilleure sensibilité (0,008 µg/L) par rapport aux immunocapteurs développés précédemment [203].

### **IV.3.3.2 Les immunocapteurs sans marquage**

L'absence de marquage dans un biocapteur est extrêmement avantageuse à cause des difficultés rencontrées lors de l'utilisation des marqueurs. Récemment, une méthode électrochimique sans marquage associant les nanoparticules magnétiques et la voltampérométrie à onde carrée a été développée et appliquée pour la détermination de l'OTA dans les raisins [204]. Des immunocapteurs compétitifs basés sur la résonance des plasmons de surface et la spectroscopie optique ont été également développés pour la détection de l'OTA dans les céréales sans étape de purification [205]. Certains auteurs ont également décrit des immunocapteurs impédimétriques pour la détection de l'OTA [194, 206].

## IV.4 Les méthodes biochimiques basées sur les aptamères

### IV.4.1 Principe

Vue la forte affinité et la sélectivité des aptamères, ces éléments de reconnaissance prometteurs sont largement utilisés dans diverses méthodes biochimiques de détection. L'utilisation des aptamères comme bio-récepteurs offre de nombreux avantages par rapport aux méthodes de détection immunochimiques.

- Les anticorps sont produits par immunisation animale, en induisant une réponse immunitaire contre une cible dans un système biologique. En revanche, les aptamères sont sélectionnés *in vitro* par des méthodes indépendantes des animaux applicables à n'importe quelle cible.
- La production des anticorps *in vivo* signifie que les sites de fixation de la cible sont identifiés par le système immunitaire animal. Les paramètres *in vivo* limitent l'identification des anticorps qui peuvent reconnaître la cible à certaines conditions physiologiques limitant ainsi l'utilisation des anticorps. Ceci n'est pas le cas des aptamères dont la sélection peut être réalisée dans des conditions particulières.
- Après la sélection, les aptamères sont synthétisés chimiquement et purifiés à un haut degré de pureté, donnant des structures hautement reproductibles et éliminant les mutations et les modifications structurales que les anticorps subissent en cours de la production. En plus, *via* une synthèse chimique, des modifications peuvent être introduites sur la séquence de l'aptamère afin d'augmenter sa stabilité, son affinité et sa spécificité.
- La nature protéique des anticorps les rendent très sensibles aux variations de température qui entraînent parfois une dénaturation irréversible. A la différence des anticorps, les aptamères sont très stables aux températures élevées et peuvent retrouver leur conformation native après une dénaturation thermique.
- La modification chimique des aptamères avec un marquage optique, groupement redox ou fonctionnels permettant leur attachement à des supports transducteurs de manière beaucoup plus facile et sélective que les anticorps (**Figure 19**).

- Contrairement aux interfaces protéiques, les phénomènes d'adsorption non spécifiques sont moins fréquents avec les acides nucléiques.

Vus leurs avantages, les aptamères ont été utilisés comme alternative aux anticorps dans de nombreuses techniques de détection comme l'approche de type ELISA [207] et les biocapteurs (aptacapteurs) [208]. Ils sont aussi à l'origine de méthodes originales de détection.

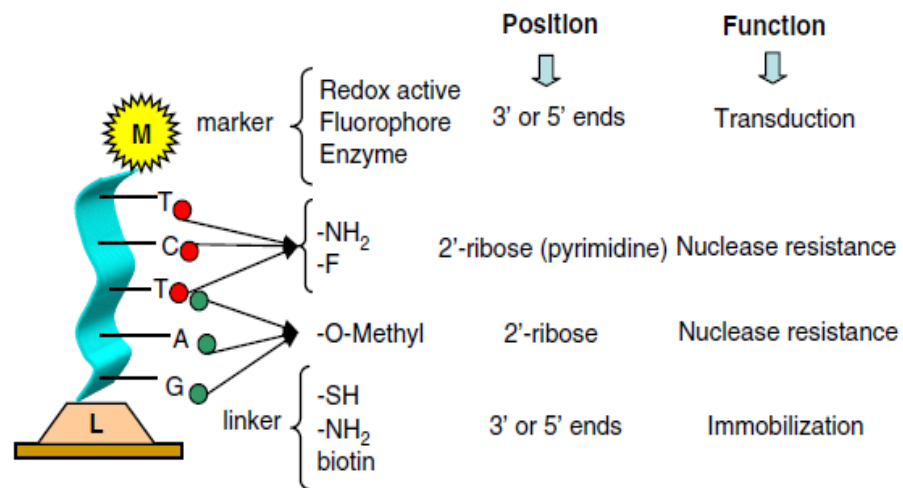


Figure 19: les différentes modifications des aptamères [132].

Puisque les aptamères imitent les propriétés des anticorps, le principe des bioessais basés sur les aptamères est le même que celui des immunoessais. Des bioessais inspirés de la technique ELISA et utilisant des aptamères ont vu le jour. Ce type de bioessai se retrouve sous plusieurs dénominations dans la littérature: ELONA (pour «Enzyme Linked Oligonucleotide Assay» qui est l'acronyme le plus courant, ELAA (pour «Enzyme Linked Aptamer Assay»); ELOSA (pour «Enzyme Linked Oligosorbent Assay ») ou encore ALISA (pour« Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay »). Les mêmes formats que pour l'ELISA sont utilisés.

## IV.4.2 Les différents formats utilisés

### IV.4.2.1 Le format «sandwich» ou «dual-site binding»

Ce format est généralement utilisé pour les macromolécules comme les protéines car ces cibles protéiques possèdent plus d'un site de fixation. Dans cette approche, une paire d'aptamères forme un sandwich pour fixer la cible. Le premier aptamère est immobilisé sur la surface d'un support transducteur, tandis que le deuxième est marqué avec un fluorophore,



enzyme...etc. Généralement, les aptamères utilisés ont des séquences nucléotidiques différentes, sauf dans certains cas comme les protéines dimériques qui contiennent deux sites de fixation identiques et le même aptamère est utilisé. Le deuxième aptamère marqué est remplacé par un anticorps marqué dans le cas d'absence de deux aptamères partageant des sites identiques de fixation de la cible. Cela peut montrer l'importance de sélectionner plusieurs aptamères pour la même molécule cible [209].

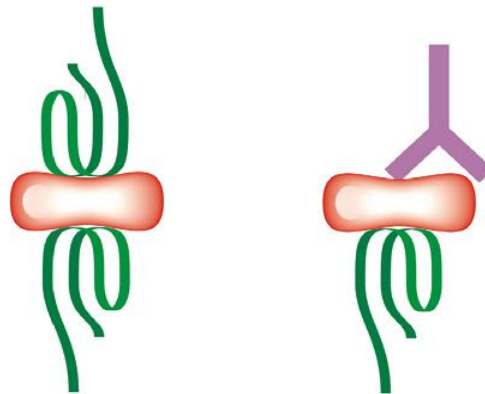
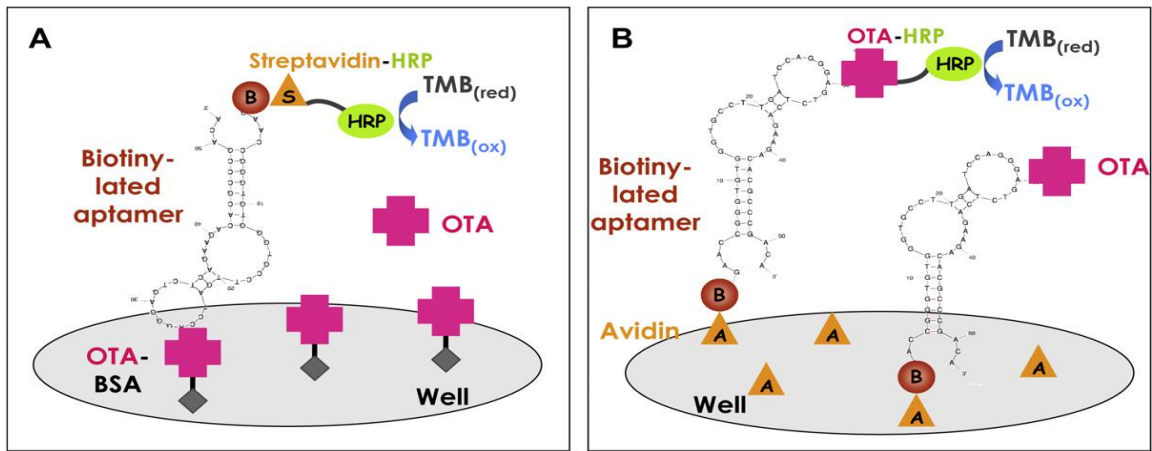


Figure 20: Les bioessais à base d'aptamères en formats sandwich aptamère-cible-aptamère et aptamère-cible-anticorps [210].

#### **IV.4.2.2 Les tests compétitifs**

Des études RMN ont montré que les cibles de faible poids moléculaire dans un complexe aptamère-cible sont entourées par le site de fixation de l'aptamère laissant une petite zone d'interaction avec une seconde molécule. Il est donc quasi impossible d'utiliser le format «dual-site binding» avec les petites molécules qui sont souvent détectées par des formats «single-site binding» [209]. Comme dans le cas des immunoessais, le format compétitif peut être direct ou indirect.



**Figure 21:** Représentation schématique de deux bioessais compétitifs pour la détermination de l'OTA (A) ELAA compétitif direct et (B) ELAA compétitif indirect [144].

Barthelmebs *et al* ont décrit la détermination de l'OTA par une ELAA compétitive directe et indirecte (**Figure 21**) [144].

Les aptamères ont été également utilisés dans des bioessais basés sur un système de déplacement dont le principe est similaire à celui des immunoessais. Un aptacapteur électrochimique ultrasensible basé sur un système de déplacement a été développé pour la détection simultanée de la thrombine et le lysozyme [211].

D'autres formats comme «Analyte-induced assembly/dissociation of the aptamer construct» ont été également publiés. Ces méthodes sont détaillées dans la revue de Cheng *et al* [210].

### IV.4.3 Les différents aptacapteurs développés pour la détermination de l'OTA

#### IV.4.3.1 Les aptacapteurs ampérométriques marqués

La flexibilité de leur structure primaire permet aux aptamères de se replier en une structure tridimensionnelle stable en se liant à leurs cibles. Cela facilite la formation du complexe aptamère-cible en marquant les caractéristiques de transfert d'électron des entités redox. En se basant sur cette stratégie, Kuang *et al* ont développé un aptacapteur électrochimique pour la détection de l'OTA dans le vin rouge. Dans cette méthode, trois molécules d'ADN simple brins, y compris l'aptamère, ont été utilisées. La première séquence (ADN 1) complémentaire à l'aptamère a été immobilisée sur la surface de l'électrode, la

deuxième séquence (ADN 3) complémentaire à l'aptamère a été fonctionnalisée par des nanoparticules d'or. Le bleu de méthylène a été utilisé comme sonde électrochimique. La compétition joue entre l'OTA et les deux séquences (ADN 1) et (ADN 3) pour se lier à l'aptamère, entraînant l'élimination de l'aptamère de la surface de l'électrode et diminuant le courant redox du bleu de méthylène [212]. Les avantages des billes magnétiques comme support d'immobilisation ont été également utilisés pour développer des aptacapteurs électrochimiques pour la détection de l'OTA [213, 214]. Il a été démontré que cette stratégie d'immobilisation permet d'améliorer les performances car les billes magnétiques augmentent la surface spécifique offrant ainsi une meilleure efficacité des interactions entre les échantillons et les réactifs. Cela permet une détection plus sensible et plus rapide. Ces aptacapteurs ont été développés pour la détection de l'OTA dans le vin et le blé. Les limites de détection obtenues étaient inférieures à celles des immunocapteurs ampérométriques développés pour la détection de l'OTA, validant l'utilisation des aptacapteurs pour la détermination de l'OTA dans les denrées alimentaires.

#### **IV.4.3.2 Les aptacapteurs sans marquage**

Afin de limiter les problèmes liés au marquage des cibles et des aptamères, plusieurs aptacapteurs sans marquage ont été mis au point. Prabhakar *et al* ont développé un aptacapteur impédimétrique en fixant de manière covalente l'aptamère spécifique de l'OTA sur un film de polyaniline-acide stéarique. La méthode développée a montré une bonne stabilité et spécificité pour la détection de l'OTA [215]. Tong *et al* ont décrit un aptacapteur électrochimique catalysé par une exonucléase. Une sonde ADN et son aptamère complémentaire ont été immobilisés sur l'électrode en or. La méthode a montré une sensibilité élevée pour l'OTA avec une limite de détection de 0,001 µg/L [216]. Très récemment, notre groupe de recherche a exploré l'immobilisation de l'aptamère sur des couches mixtes organisées de sels de diazonium par «click chemistry». L'aptamère a été utilisé dans le développement d'un aptacapteur impédimétrique électrochimique sensible et réutilisable pour la détection de l'OTA dans une gamme de concentrations variant de 1,25 ng/L à 500 ng/L avec une limite de détection de 0,25 ng/L [217].

#### **IV.4.3.3 Les aptacapteurs luminescents**

La luminescence devient un outil de plus en plus utilisé dans le domaine des biocapteurs. Wang *et al* ont mis au point un aptacapteur électrochimiluminescent en utilisant

un aptamère spécifique de l'OTA comme élément de reconnaissance et le N-(4-aminobutyl)-N-éthyle-isoluminol comme composé producteur du signal. L'aptacapteur a été fabriqué en immobilisant l'aptamère sur la surface d'une électrode en or modifiée avec des nanoparticules d'or. La méthode a été utilisée sur des échantillons de blé et validée par la méthode officielle [218].

## V. Objectifs de la thèse

Les avantages des aptamères et la toxicité de l'OTA sont rapportés dans la revue bibliographique. La présente thèse intitulée « développement de systèmes bio-analytiques pour la détection et la quantification des mycotoxines », a visé principalement à la mise au point de deux dispositifs à base d'aptamères pour l'extraction et la détection de l'OTA dans les denrées alimentaires.

Dans la première partie nous nous sommes intéressés à développer des colonnes d'affinité à base d'aptamères pour l'extraction de l'OTA à partir de matrices alimentaires. L'immuno-extraction sur des colonnes d'immunoaffinité est la méthode de référence pour l'extraction de l'OTA. Cette méthode est basée sur une forte interaction Anticorps-Antigène, mais les anticorps manquent de stabilité et sélectivité. De plus, ces colonnes d'immunoaffinité sont très onéreuses et non recyclables. Des colonnes d'affinité à base d'aptamère seront donc développées pour l'extraction de l'OTA à partir de la bière. Elles seront par la suite validées par comparaison en termes de performance et de régénération avec des colonnes d'immunoaffinité commerciales.

Dans une deuxième partie, nous avons visé à mettre au point un biocapteur à base d'aptamère couplé à un système automatisé de flux pour la détection de l'OTA. Aucun aptacapteur en flux n'a été rapporté dans la littérature, que ce soit pour l'OTA ou pour une autre cible. Tous les aptacapteurs décrits pour la détermination de l'OTA sont développés en « batch ». Malgré leur efficacité et leur sensibilité, ces méthodes sont laborieuses avec un temps de manipulation long d'où l'importance d'intégrer un système automatisé à flux pour faciliter les tâches. L'incorporation d'un tel système aide à contrôler les procédures, simplifier la séquence des étapes permettant ainsi une simple optimisation des conditions de réaction. Un aptacapteur compétitif automatisé en flux est donc développé par utilisation de

billes magnétiques comme support d'immobilisation, où les deux formats de compétition direct et indirect seront exploités. La validation de l'aptacapteur est réalisée en l'utilisant dans la détection en ligne de l'OTA dans des échantillons de bière.

Le dernier objectif de la thèse était de transférer les techniques mises au point pour l'extraction et la détection d'une autre mycotoxine (OTB) de la même famille que l'OTA. Bien que cette ochratoxine possède une structure très proche de celle de l'OTA, l'OTB n'est pas reconnue par l'aptamère spécifique de l'OTA. Un autre aptamère spécifique de l'OTB est donc en cours de sélection *in vitro* par SELEX.

## *Chapitre 2*

# *Développement d'oligoadsorbants pour l'extraction et la quantification de l'ochratoxine A*

# Introduction

L'objectif principal de cette partie du travail est de développer des colonnes d'extraction à base d'aptamères ou oligoadsorbants. Deux aptamères et trois supports d'immobilisation sont testés. Un seul aptamère est sélectionné pour sa capacité de rétention de l'OTA. Cet aptamère modifié avec un groupement amine est immobilisé de façon covalente sur un support de sépharose activée par le bromure de cyanogène. Des supports de contrôle sans aptamère ou fonctionnalisés avec un aptamère négatif sont également préparés et étudiés en parallèle. Les colonnes développées sont étudiées en termes de rétention, spécificité et sélectivité pour être appliquées sur des échantillons réels de bière. L'oligoadsorbant développé est comparé à des colonnes d'immunoaffinité commerciales. Les profils d'extractions montrent une performance comparable pour les deux adsorbants avec une possibilité de réutilisation de notre oligoadsorbant sans perte significative de leur capacité de fixation.

## I. Synthèse des oligoadsorbants

### I.1 Présentation des aptamères anti-OTA utilisés

#### I.1.1 L'aptamère 1.12.2

Cet aptamère de 36 désoxyribonucléotides, a été sélectionné en 2008 par Cruz-Agado et Penner [119]. Chaque cycle de sélection consiste à charger la librairie d'ADN simple brin dans une colonne d'affinité contenant l'OTA immobilisée. La colonne a été lavée par un tampon de fixation et les séquences les plus affines pour l'OTA ont été éluées par l'OTA libre et amplifiées par PCR. L'ADN simple brin a été récupéré en utilisant une amorce anti-sens biotinylée et a été réappliquée à d'autres colonnes contenant l'OTA immobilisée. Cet aptamère a été sélectionné dans un tampon de sélection (10 mM HEPES, pH=7,1, 20 mM NaCl, 5mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>) où la constante de dissociation a été évaluée à 0,2  $\mu$ M. Une étude de l'influence des cations divalents sur cette constante a permis d'abaisser sa valeur à 50 nM dans le tampon de fixation: 10 mM TRIS, pH 8.5, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, et 20

5'-GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGAGCATCGGACA-3'

Figure 22: Séquence de l'aptamère 1.12.2 anti-OTA.

mM CaCl<sub>2</sub>. Les auteurs ont démontré que l'aptamère 1.12.2 ne reconnaît pas certains composés dont la structure est similaire à celle de l'OTA comme N-acétylphénylalanine et la warfarine, et présente 100 fois moins d'affinité pour l'OTB.

Aucune structure secondaire n'a été suggérée pour cet aptamère, mais des doublets ou des triplets de guanines présents à plus de quatre reprises dans la séquence indiquent qu'une structure en tétrades de guanines est probable.

### **I.1.2 L'aptamère H12**

Cet aptamère, de 30 désoxyribonucléotides, a été sélectionné par Barthelmebs *et al* en 2011 [144]. Chaque cycle de sélection consiste à incuber une librairie d'ADN simple brin avec des billes magnétiques modifiées par l'OTA. Après lavage, les billes sont lavées et resuspendues dans l'eau et les séquences les plus affines pour l'OTA ont été éluées par chauffage à 80° pendant 1 minute. L'ADN simple brin a été amplifié par PCR en utilisant une amorce anti-sens biotinylée qui permet la purification alcaline des aptamères sur des billes-streptavidine. L'aptamère a été sélectionné dans un tampon de fixation (PBS 1x, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% Tween 20, pH7,4) où la constante de dissociation a été évaluée à 96nM. L'aptamère présente une légère réactivité croisée avec la phénylalanine et l'OTB.

5'-CGGGTGTGGGTGCCTTGATCCAGGGAGTCT-3'

Figure 23: Séquence de l'aptamère H12 anti-OTA.



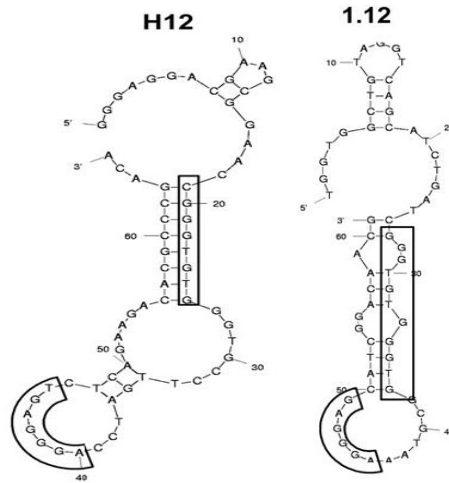


Figure 24: Les structures prédites des aptamères H12 et 1.12.2 [144].

## I.2 Présentation des supports d'immobilisation utilisés

### I.2.1 Le gel d'agarose activé par la streptavidine

Pour produire l'agarose activé par la streptavidine, la streptavidine est fixée sur les billes d'agarose par liaison covalente *via* un bras espaceur de 15 atomes hydrophiles. Ce bras espaceur permet de réduire les interactions non spécifiques et d'assurer la fixation optimale des biomolécules biotinylées. Le gel d'agarose activé-streptavidine utilise la forte interaction non covalente streptavidine-biotine. La constante de dissociation de ces deux molécules libres en solution est de l'ordre de  $4 \times 10^{-14}$  M [219]. La streptavidine est une protéine tétramère, c'est-à-dire qu'elle possède quatre sites de fixation de la biotine. Ces propriétés permettent un protocole d'immobilisation très simple, consistant en l'incubation des aptamères biotinylés avec l'adsorbant. La spécificité du greffage par la biotine, située à l'extrémité de l'aptamère, entraîne un couplage orienté, ce qui permet de conserver les propriétés de fixation de ce dernier à sa cible.

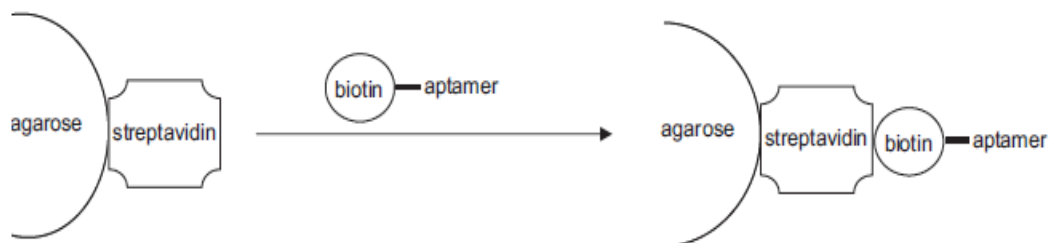


Figure 25: Immobilisation de l'aptamère biotinylé sur l'agarose activé par la streptavidine [220].

Ce support d'immobilisation est utilisé pour développer un oligoadsorbant à base de l'aptamère H12 biotinylé.

## I.2.2 Le gel de silice activée par la glutaraldéhyde

L'activation des supports par la glutaraldéhyde est l'une des techniques les plus utilisées pour immobiliser les enzymes et elle peut être prometteuse dans l'immobilisation des biomolécules modifiées avec un groupement amine. Le gel de silice est un polymère amorphe inorganique composé de groupements siloxane (Si-O-Si) à l'intérieur et des groupements silanol (Si-OH) distribués sur sa surface. Les modifications chimiques de ce polymère sont liées à la présence des groupements silanol à sa surface. La glutaraldéhyde est utilisée comme un «linker» pour l'immobilisation des biomolécules aminées où les groupements amines forment une base de Schiff avec la glutaraldéhyde. Cela permet l'immobilisation simple et stable des aptamères modifiés avec une amine.

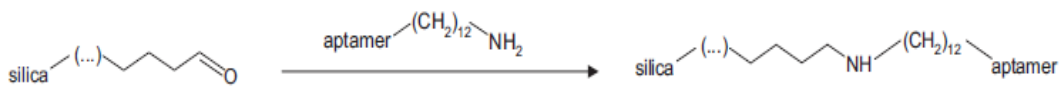


Figure 26: Immobilisation d'aptamère amino-modifié sur la silice activée par la glutaraldéhyde [220].

Ce support d'immobilisation est utilisé pour développer un oligoadsorbant à base de l'aptamère H12 biotinylé.

## I.2.3 Le gel de sépharose activé par le bromure de cyanogène

La sépharose est une marque déposée d'un polysaccharide (poly-agarose) sous forme de billes extraites des algues. Plusieurs groupements fonctionnels sont utilisés pour activer la sépharose, cette méthode est utilisée pour immobiliser les enzymes et les anticorps. Le nom de la marque est dérivé de **S**éparation-**P**harma-**A**garose.

Le bromure de cyanogène (CNBr) réagit avec les groupements OH de la sépharose et forme des esters ou des imidocarbonates qui se lient aux amines de l'aptamère modifié et donnant une fixation covalente de l'aptamère sur le gel de sépharose.

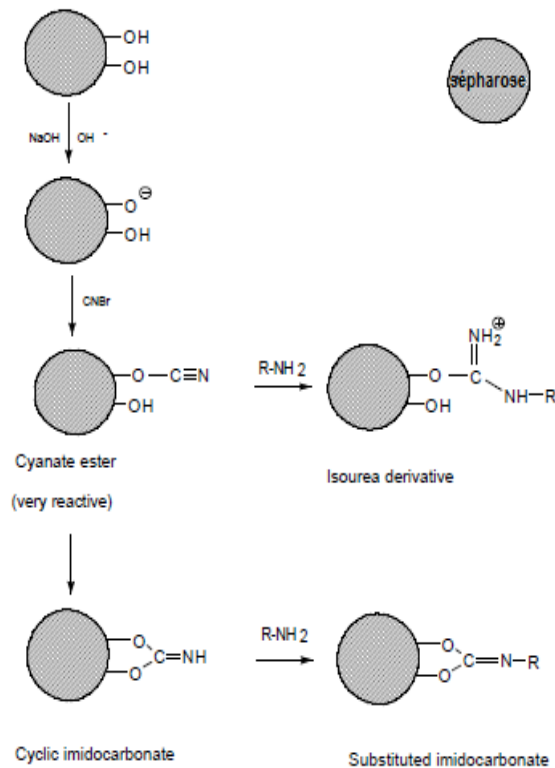


Figure 27: Schéma d'activation de la sépharose par le bromure de cyanogène CNBr.

Ce support d'immobilisation est utilisé pour développer un oligoadsorbant à base de l'aptamère 1.12.1 et un oligoadsorbant à base de l'aptamère H12, les deux aptamères sont modifiés avec une amine.

## I.3 Protocole de synthèse des oligoadsorbants

### I.3.1 Réactifs

- Aptamère 1.12.2 anti-OTA amino-modifié en 5' dont la séquence est: 5'-GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGAGCATCGGACA-3', (Eurogentec, Angers, France);
- Aptamère H12 anti-OTA amino-modifié ou biotinylé en 5' dont la séquence est: 5'-CGGGTGTGGGTGCCTTGATCCAGGGAGTCT-3', (Eurogentec, Angers, France);
- Aptamère négatif amino-modifié en 5' dont la séquence est: 5'-GGGAGGACGAAGCGGAACCCAGAAAGACACGCCCGACA-3', (Eurogentec, Angers, France);

- Sépharose activée CNBr (4B, 90 $\mu$ m), (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- Agarose activée streptavidine (CL-4B), (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- Billes de silice–NH<sub>2</sub> préparées au laboratoire;
- Glutaraldéhyde 25%, (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- HCl (Carlo-Erba, Italie);
- Tampon Phosphate (PBS) (8g de NaCl, 0,2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,13 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0,2g de KCl dans 1L d'eau distillée), (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- EDTA (Ethylenedinitrilotetraacetic acid),(Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- Acétonitrile HPLC gradient, (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- Tampon (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, pH8), soit 28,39g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0,47g de MgCl<sub>2</sub> dans 1L d'eau distillée, (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- Tampon (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200mM, pH8), soit 28,39g dans 1L d'eau distillée (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- Super Block Blocking Buffer, (Thermo Scientific, Rockford, USA);
- Tampon (Tris 0,1M, pH8), soit 12,11g dans 1L d'au distillée, (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- Tampon (acétate 0,1M, NaCl 0,5M, pH4), soit 13.6g d'acétate de sodium et 29g de NaCl dans 1L d'eau distillée, (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- Tampon (Tris 0,1M + NaCl 0,5M, pH8), soit 12,11g de tris et 29g de NaCl dans 1L d'eau distillée, (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- Tampon de sélection Tris hydrochloride 200mM, NaCl 140mM, KCl 5mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, pH 8.5, soit, 3.152g de Tris hydrochloride, 8.12g de NaCl, 0.37g de KCl et 95.22 mg de MgCl<sub>2</sub> dans 1L d'eau distillée, (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- Solution de décrochage méthanol: acide acétique (98:2) (v/v), (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);

## **I.3.2 Méthode**

### **I.3.2.1 Le gel d'agarose activé par la streptavidine**

La procédure de synthèse de ce support d'immobilisation est adaptée de la procédure publiée par Madru *et al* pour la mise au point d'un oligoadsorbant pour l'extraction de la cocaïne [220]. 0,1 mg d'aptamère H12 sont dissoutes dans 3 mL de PBS contenant 1mM d'EDTA, chauffées pendant 5 minutes à 75°C en utilisant un thermocycler mastercycler (Eppendorf, Le Pecq, France) et laissées à température ambiante pendant 30 minutes. La solution d'aptamère renaturée est ajoutée à 300 µL de suspension d'agarose-streptavidine et incubée une nuit à température ambiante. L'adsorbant est ensuite chargé entre deux frittés dans une cartouche SPE de 1 mL (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France) et lavé par 10 mL de PBS (EDTA 1mM).

Un support de contrôle sans aptamère est préparé afin d'évaluer la spécificité du système.

### **I.3.2.2 Le gel de silice activée par la glutaraldéhyde**

60mg de billes de silice-NH<sub>2</sub> sont lavées 3 fois avec 1 mL de tampon de sélection et mélangées avec 600 µL de glutaraldéhyde 2,5% pendant 2 heures à température ambiante. L'excès de glutaraldéhyde est éliminé par 3 lavages en utilisant 1 mL de tampon de sélection. 150 µL d'aptamère H12, à 1 mg/ml, renaturé sont incubés avec le support pendant la nuit à 4°C. L'adsorbant est ensuite chargé entre deux frittés dans une cartouche SPE et lavé par 3 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (200 mM, pH8). Deux types de blocage ont été testés afin de neutraliser les sites actifs n'ayant pas réagi; 1 mL de Tris 0,1 M, pH8 ou le tampon de blocage (Super Block Blocking Buffer).

Deux supports de contrôle sont synthétisés; le premier support contenant le gel de silice sans glutaraldéhyde et sans aptamère et le deuxième contenant le gel de silice activée par la glutaraldéhyde mais sans aptamère.

### **I.3.2.3 Le gel de sépharose activée par le CNBr**

Avant immobilisation, la solution d'aptamère (1.12.1 ou H12) solubilisé à 0,2 mg/mL dans le tampon de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (200mM) et MgCl<sub>2</sub> (5mM) pH=8 est chauffée à 75 °C pendant 5 min et laissés 30 min à température ambiante. 35 mg de sépharose activée par le CNBr sont

rincés 6 fois par 1 mL de HCl 1mM, puis par 1 mL d'eau distillée, et enfin par 175  $\mu$ L de tampon  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (200mM), et  $\text{MgCl}_2$  (5mM) pH=8. 150  $\mu$ L de la solution d'aptamère

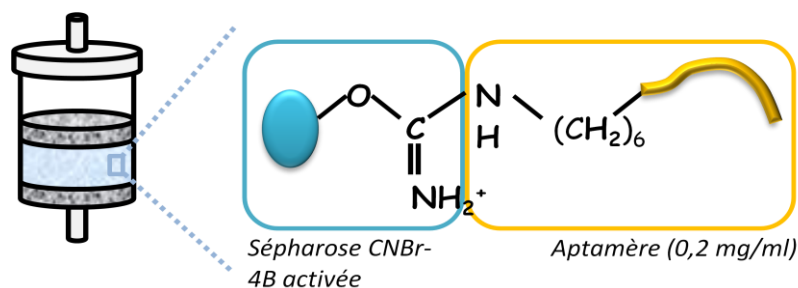


Figure 28: Synthèse d'un oligoadsorbant à base de sépharose activée par le CNBr.

sont incubés avec le support une nuit à température ambiante. L'adsorbant est ensuite placé entre deux frittés dans une cartouche SPE de 1 mL et lavé par 3 mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (200mM, pH 8). Les sites actifs du support n'ayant pas réagi sont neutralisés par une solution de Tris (0,1M, pH=8) pendant 2 heures. Le gel est ensuite lavé alternativement, trois fois par 2 mL de tampon acétate (0,1M) et NaCl (0,5M) pH=4 et 2 mL de tampon Tris (0,1M) et NaCl (0,5M) pH=8.

Afin d'évaluer la spécificité de notre système, deux supports de contrôle, l'un contenant la sépharose sans aptamère et l'autre, la sépharose fonctionnalisée avec un aptamère négatif ne reconnaissant pas l'OTA sont préparés et étudiés en parallèle.

## II. Procédure d'extraction (Oligoextraction)

Avant l'oligoextraction, chaque oligoadsorbant est conditionné avec 5 mL de tampon de sélection (TS). Ensuite, 200 $\mu$ L d'OTA préparés dans du TS sont filtrés sur l'oligoadsorbant, cette cible sera retenue par l'aptamère anti-OTA immobilisé sur le gel de sépharose. Un lavage avec 300 $\mu$ L de tampon de sélection est effectué afin d'éliminer les impuretés pouvant être liées de façon non spécifique au support. L'analyte est ensuite élué du support à l'aide de 400 $\mu$ L d'une solution de désorption (méthanol: acide acétique) (98:2). Finalement, la fraction d'élution est diluée une fois dans de l'eau ultra-pure et quantifiée par CLHP-FD. L'oligoadsorbant est régénéré par 5ml de TS pour une nouvelle utilisation.

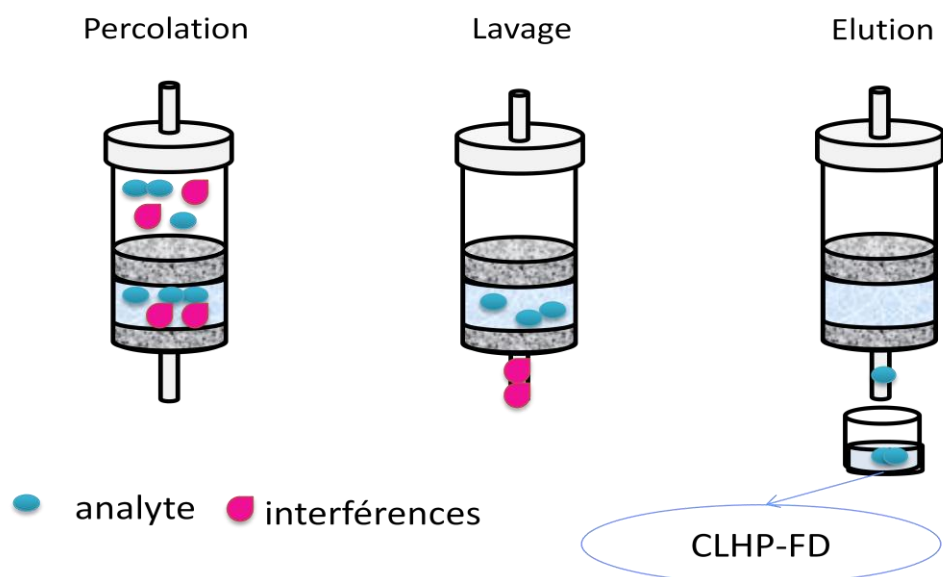


Figure 29: Procédure d'oligoextraction de l'OTA.

### III. Détermination par CLHP-FD et étalonnage

Le système CLHP est composé d'une pompe LaChrom L-7110 (Hitachi, Merck, Allemagne) et d'un détecteur de fluorescence Elite LaChrom L-2485 (Hitachi, VWR, France). Les données sont enregistrées à l'aide d'un logiciel de chromatographie BORWIN (JMBS development, Grenoble, France). Les conditions de l'analyse CLHP-FD sont montrées dans le . La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne Kinetex 100A C 18 (100 x 4,60 nm, 2,6  $\mu$ m) (Phenomenex, Etas unis). La phase mobile est isocratique à 1 mL/minute, et composée de Acétonitrile / Eau / acide acétique (51 / 47 /2, v/v). La fluorescence est mesurée à une longueur d'onde de 460 nm après excitation à 330 nm. L'OTA est quantifiée en mesurant l'aire de pic au temps de rétention de l'OTA et par comparaison à une courbe de calibration. Les solutions standards pour la courbe de calibration sont préparées dans la phase mobile à partir d'une solution mère d'OTA de 25 mg/mL préparée dans du méthanol 100% (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Trois injections au minimum sont effectuées et la moyenne des aires de pic obtenues est calculée.

Trois solutions standards d'OTA de concentrations 1 ng/mL, 2 ng/mL (la quantité maximale d'OTA permise dans le vin) et 3 ng/mL sont analysées par CLHP-FD, les aires de pic sont utilisées pour tracer la courbe d'étalonnage (**Figure 30**).

Tableau 6: Les conditions de CLHP pour la détermination de l'OTA

Colonne	Kinetex 100A C18 (100 × 4,60 nm, 2,6 µm)
Température de la colonne	Température ambiante
Flux	1 mL/minute
Longueurs d'onde	Ex: 330 nm; Em: 460 nm
Volume d'injection	100 µL (20 µL chargés dans la boucle)
Phase mobile	Acétonitrile: eau: acide acétique (51:47:2, v/v)

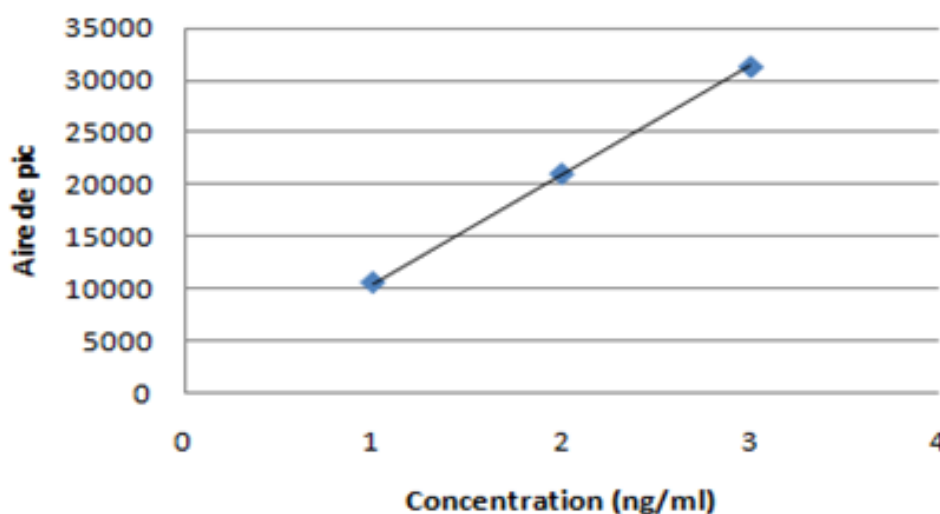


Figure 30: Courbe d'étalonnage CLHP-FD des standards OTA préparés dans le tampon de sélection.

## IV. Application sur des échantillons réels: Bière

Les oligoadsorbants sont validés en appliquant la méthode développée sur un échantillon réel de bière blonde de Kronenbourg (Strasbourg, France). Avant utilisation, un



échantillon de bière est directement injecté en CLHP-FD afin de confirmer l'absence d'une contamination de la bière. Effectivement, aucun pic n'a été détecté dans le chromatogramme (Figure 31).

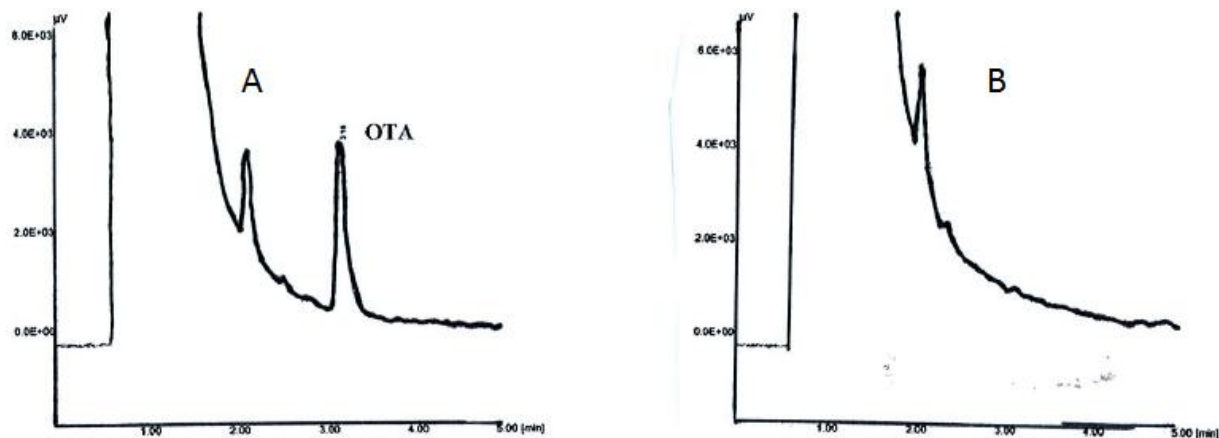


Figure 31: Comparaison d'un chromatogramme obtenu après injection d'un échantillon de bière enrichi en OTA (A) et d'un chromatogramme obtenu après injection directe d'un échantillon de bière en CLHP-FD.

## IV.1 Prétraitement de l'échantillon

Les échantillons de bière ont été préparés selon un protocole d'une précédente étude [221]. La bière a été enrichie en utilisant la solution mère d'OTA afin d'obtenir des concentrations finales de 1, 2 et 3 ng/mL. Ensuite, les échantillons de bière ont été refroidis à 4°C pendant 30 minutes afin d'éviter la formation de mousse qui peut entraîner le débordement de l'échantillon. Ils ont été dégazés par sonification pendant 1 heure. Le pH de la bière a été ajusté à 8,5 avec du NaOH 1M. Finalement, la bière est filtrée par des filtres seringues (0,45µm), (Starorius Stedim biotech, Allemagne).

Les trois échantillons de bière enrichis en OTA ont été analysés par CLHP-FD, les aires de pics obtenues ont été utilisées pour tracer la courbe d'étalonnage présentée dans la Figure 32.

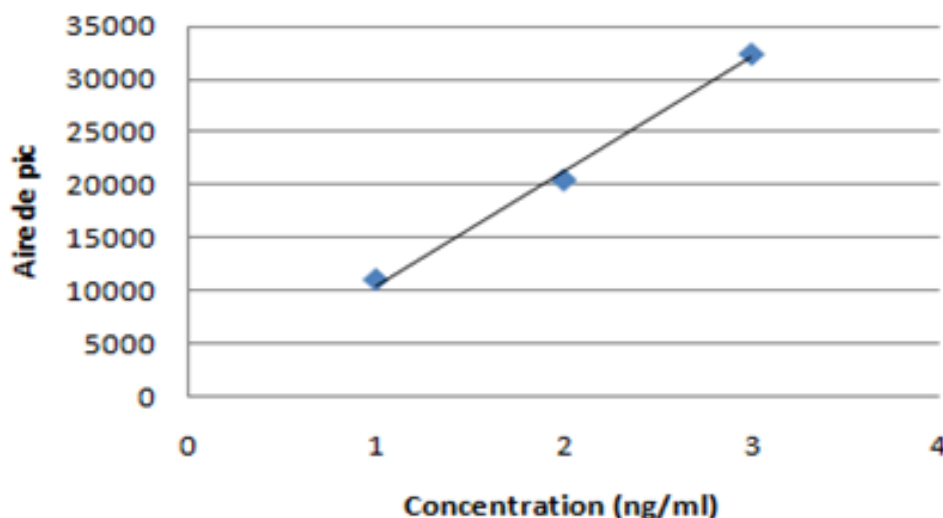


Figure 32: Courbe d'étalonnage CLHP-FD des échantillons de bière dopés d'OTA.

## IV.2 Immunoextraction de l'OTA de la bière par des colonnes d'immunoaffinité commerciales

Comme évoqué précédemment, la méthode la plus fréquemment utilisée pour la quantification de l'OTA dans les matrices alimentaires est la CLHP-FD. Malgré la présence de plusieurs méthodes de prétraitement des échantillons alimentaires, la principale pour l'extraction et la purification, dans les différentes matrices est l'immunoextraction par des colonnes d'immunoaffinité (IACs). L'organisation internationale de la vigne et du vin (OIV) a établi une méthode analytique de référence pour la quantification de l'OTA dans le vin, prétraitement avec des IACs et quantification par CLHP-FD [222]. Plusieurs études ont été publiées sur l'immunoextraction de l'OTA du vin et à partir d'autres matrices alimentaires [223-225].

Plusieurs IACs sont disponibles sur le marché. Dans ce travail, les IACs Ochrapreps de R-Biopharm (Saint-Didier au Mont D'Or, France) ont été utilisées pour valider la méthode d'oligoextraction développée.

Afin d'extraire l'OTA de la bière, les notes techniques du fournisseur ont été suivies. La bière enrichie a été dégazée sous sonification pendant 30 à 60 minutes, puis le pH de la bière a été ajusté à 7,2 avec une solution de NaOH. Par la suite, 20 mL de bière sont filtrés sur la colonne d'immunoaffinité par gravité. La colonne a été lavée avec 20 mL de PBS et séchée

par passage d'air au travers de la colonne. L'OTA reconnue par l'anticorps immobilisé sur la colonne a été éluée avec 1,5 mL d'une solution de désorption (méthanol: acide acétique) (98:2, v/v). La fraction d'éluée a été diluée dans 1,5 mL d'eau distillée et a été ensuite analysée par CLHP-FD pour la quantification de l'OTA en comparant les aires de pics obtenues à celles des solutions standards d'OTA.

### **IV.3 Oligoextraction de l'OTA de la bière**

Après validation de la méthode d'oligoextraction sur des solutions témoins préparés dans le tampon, les oligoadsorbants ont été utilisés pour extraire l'OTA des échantillons de bière enrichis. La même procédure d'oligoextraction, décrite dans II a été utilisée.

## **V. Résultats et discussion**

### **V.1 Performance des oligoadsorbants**

#### **V.1.1 Oligoadsorbant à base de l'aptamère H12**

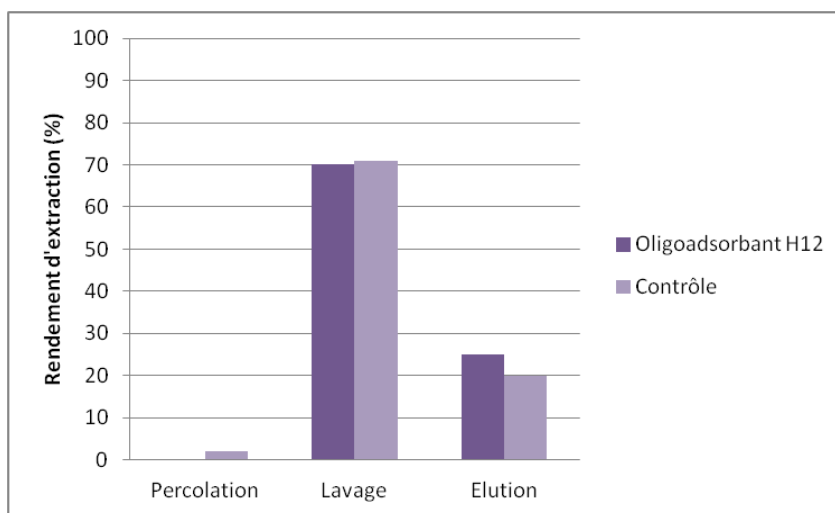
##### **V.1.1.1 Immobilisation de l'aptamère H12 sur le gel de sépharose activée par le CNBr**

En premier, l'aptamère H12 amino-modifié a été immobilisé sur le gel de sépharose activée-CNBr selon le protocole décrit dans le I.3.2. Afin de confirmer la fixation de l'aptamère sur le support de sépharose, l'absorption (A) de la solution d'aptamère a été mesurée par spectrophotométrie à 260 nm avant ( $S_0$ ) et après l'immobilisation ( $S_1$ ). Les résultats sont présentés dans le .

Tableau 7: Résultats des mesures spectrophotométriques de la solution d'aptamère avant et après l'immobilisation sur le support de sépharose

Solution	$S_0$	$S_1$
Absorption (A)	1,80	0,089

Ces résultats montrent que 95 % de la quantité d'aptamère a été immobilisée sur le gel de sépharose. La rétention de l'oligoadsorbant H12 et de l'oligoadsorbant de contrôle, préparé sans aptamère, a été testée sur une solution standard d'OTA dont la concentration est de 2 ng/mL. Les résultats sont présentés dans la **Figure 33**.



**Figure 33:** Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant H12 et l'oligoadsorbant de contrôle préparés à base de sépharose activée par le CNBr.

D'après le profil d'extraction, l'OTA n'a pas été accrochée sur l'oligoadsorbant car, d'une part, il n'y a pas de différence de rétention entre le contrôle et l'oligoadsorbant, d'autre part, 70% de la quantité d'OTA percolée a été décrochée au moment du lavage. Cela peut donc être expliqué par les interactions non spécifiques développées sur les deux supports.

Ce résultat est peut être du au fait que l'aptamère H12 ne reconnaît pas sa cible lorsqu'il est immobilisé sur un support. Pour vérifier cette hypothèse, l'aptamère a été incubé avec l'OTA avant immobilisation sur le support. Pour cela, le même protocole de synthèse a été utilisé en incubant 200  $\mu\text{L}$  d'OTA avec 150  $\mu\text{L}$  d'aptamère pendant 30 minutes à température ambiante, le mélange aptamère-cible a été ensuite incubé avec le gel de sépharose pendant la nuit à température ambiante. Après incubation, le surnageant a été récupéré et analysé par CLHP-FD ainsi que la fraction de lavage par le  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 34**.

D'après les résultats obtenus avec ou sans pré-incubation de l'aptamère avec l'OTA, on constate que l'aptamère ne fixe pas sa cible dans ces conditions de travail. Un autre support d'immobilisation a été donc testé.

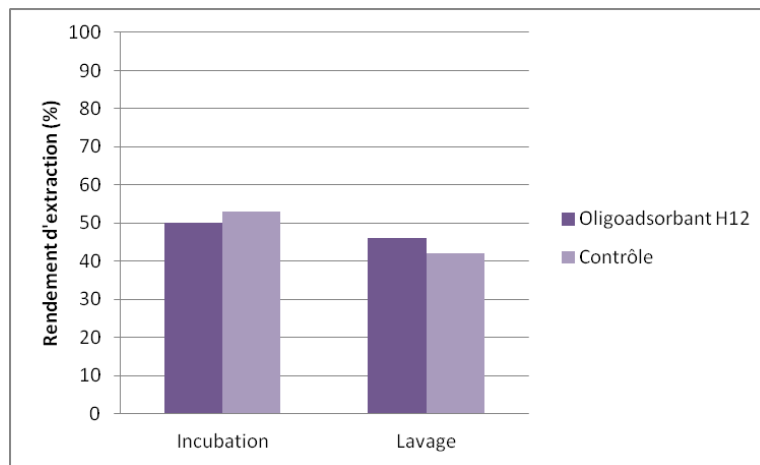


Figure 34: Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant à base d'aptamère H12 et de la sépharose activée-CNBr, avec une pré-incubation de l'aptamère avec l'OTA.

### V.1.1.2 Immobilisation de l'aptamère H12 sur le gel de silice activée par la glutaraldéhyde

En changeant le support d'immobilisation, l'oligoadsorbant H12 ainsi que les deux supports de contrôle développés en parallèle ont été utilisés dans l'extraction de l'OTA à partir d'une solution standard. 200  $\mu$ L de solution standard d'OTA (2 ng/mL) ont été percolés, l'oligoadsorbant a été ensuite lavé par 300  $\mu$ L d'acétonitrile 10% préparé dans le tampon de sélection, enfin, l'élution de l'OTA a été réalisée par 400  $\mu$ L de la solution de désorption (méthanol: acide acétique) (98:2, v/v). La fraction d'élution a été diluée une fois dans l'eau et a été analysée par CLHP-FD. Les résultats de l'extraction obtenus sur les cinq oligoadsorbants sont présentés dans la **Figure 35**.

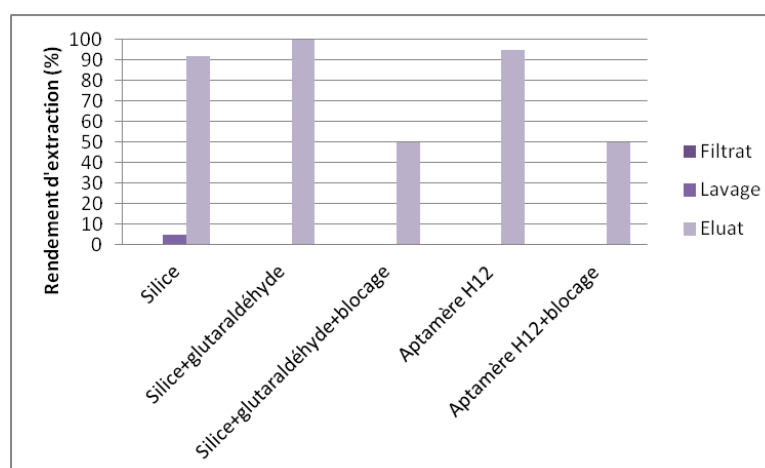


Figure 35: Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant à base d'aptamère H12 et de la silice activée-glutaraldéhyde.

L'absence d'OTA dans la fraction de percolation montre la capacité des cinq supports à accrocher l'OTA. Après lavage des oligoadsorbants avec l'acétonitrile 10%, seule la fraction de lavage du support de silice contient de l'OTA. Lors de l'éluion, toute l'OTA percolée sur les supports est récupérée ce qui n'est pas le cas en utilisant le tampon de blocage où la récupération n'est que de moitié.

Tout comme les deux supports d'immobilisation précédents. Le support d'agarose activé par la streptavidine a été aussi utilisé et a donné les mêmes résultats obtenus avec le gel de sépharose et de silice.

La recherche des causes et l'optimisation des procédures d'immobilisation de l'aptamère H12 seraient longues et fastidieuses étant donné le nombre d'étapes impliquées. Le développement d'un oligoadsorbant à base de l'aptamère H12 a donc été abandonné pour développer un oligoadsorbant à base de l'aptamère 1.12.2.

## V.1.2 Oligoadsorbant à base de l'aptamère 1.12.2

L'aptamère 1.12.2 amino-modifié a été immobilisé sur le gel de sépharose-CNBr activé afin de développer un oligoadsorbant pour l'extraction de l'OTA. L'oligoadsorbant a été évalué, en premier lieu, en termes de rétention et de spécificité sur une solution standard d'OTA à une concentration de 2 ng/mL. La spécificité a été testée en utilisant, en parallèle, deux supports de contrôle, un non fonctionnalisé par l'aptamère et l'autre fonctionnalisé avec un aptamère négatif ne reconnaissant pas l'OTA (**Figure 36**).

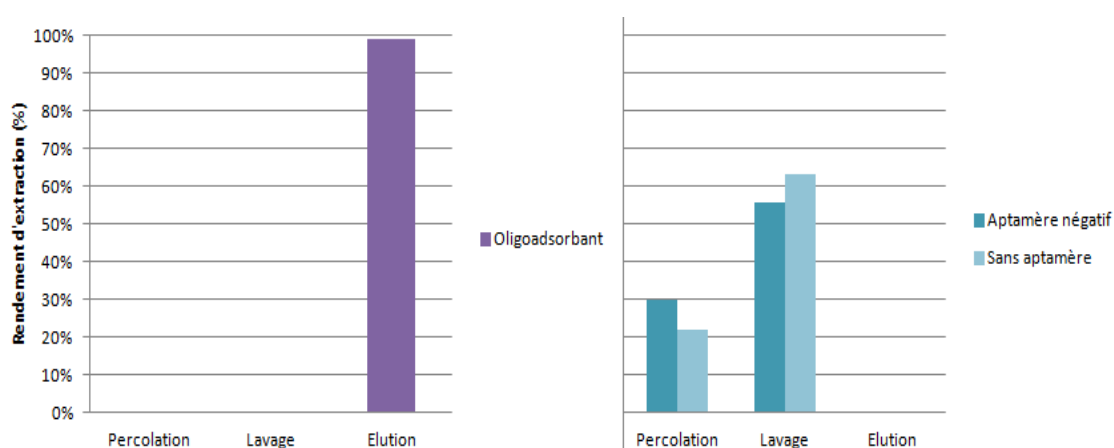


Figure 36: Comparaison des profils d'éluion de l'OTA par l'oligoadsorbant et les supports de contrôle.

Les profils d'élution de l'oligoadsorbant et des supports de contrôle montrent une différence remarquable:

- Dans le profil d'élution de l'oligoadsorbant, on remarque l'absence de l'OTA dans les fractions de percolation et de lavage montrant la bonne rétention de l'OTA par l'adsorbant, le bon rendement d'oligoextraction de l'OTA obtenu (99%) montre l'efficacité de la solution de décrochage utilisée.
- Dans le profil d'élution des supports de contrôle, la quantité d'OTA percolée a été décrochée pendant les étapes de percolation et de lavage. Le rendement d'oligoextraction de l'OTA était de 0% vu que l'OTA a été décrochée avant l'étape d'élution. Ces résultats montrent que l'OTA a été retenue par des interactions non spécifiques faciles à rompre par une simple étape de lavage avec le tampon de lavage. Cela confirme que l'aptamère 1.12.2 immobilisé sur le support reconnaît bien l'OTA et montre la spécificité de l'oligoadsorbant développé.

Après la confirmation de la bonne rétention et la spécificité de l'oligoadsorbant, la méthode développée a été testée sur une gamme de trois solutions standards d'OTA dont les concentrations étaient 1, 2 et 3 ng/mL. Afin d'évaluer la bonne reproductibilité de la méthode, chaque oligoextraction a été répétée 3 fois en utilisant 3 différents oligoadsorbants, la moyenne et l'écart type ont été calculés (**Figure 37**).

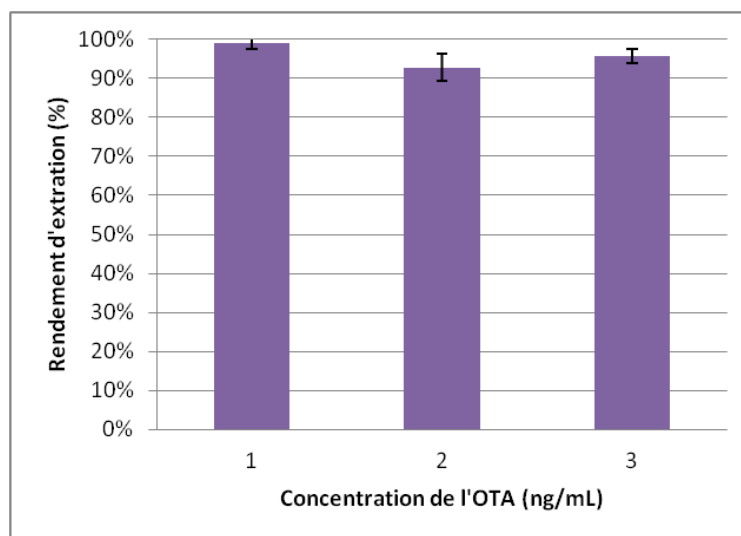
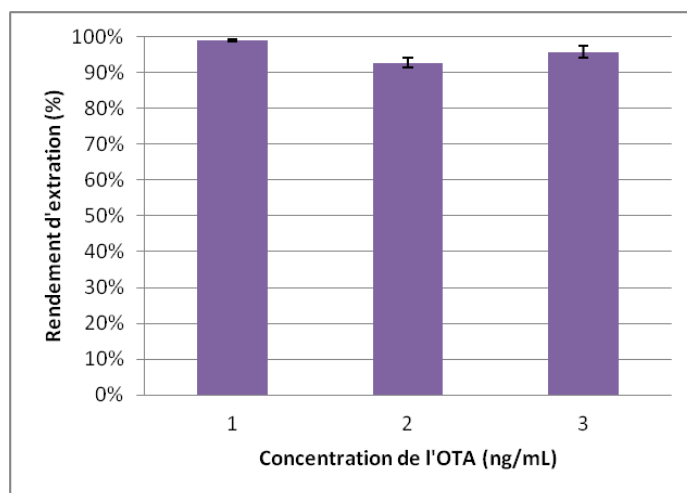


Figure 37: Performance de l'oligoadsorbant avec les solutions standards d'OTA.

Les bons rendements obtenus, compris entre 90 et 100%, démontrent la capacité d'élution de la solution de désorption et l'efficacité de l'oligoadsorbant synthétisé. Les faibles écarts types montrent que la méthode d'oligoextraction est répétable.

La méthode a été ensuite validée par application sur trois échantillons de bière prétraités et enrichis avec trois concentrations d'OTA (1, 2 et 3 ng/mL), les résultats sont présentés dans **Figure 38**.

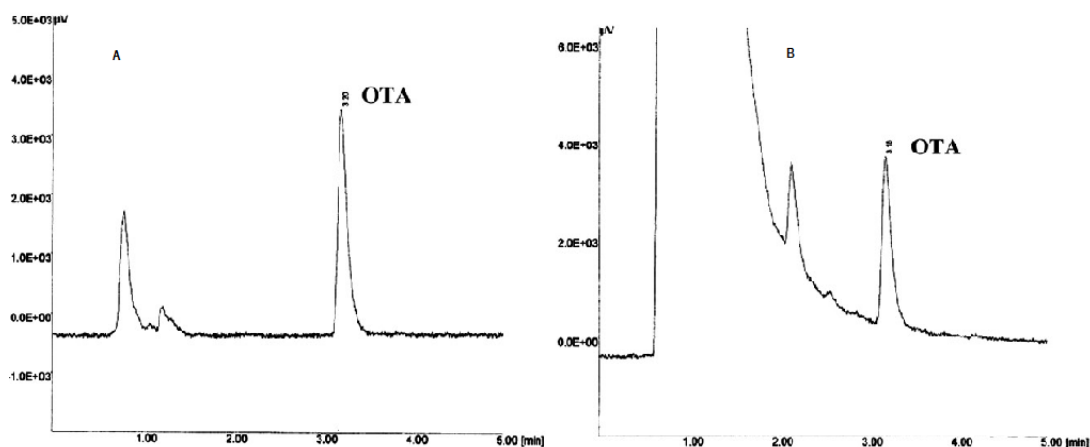


**Figure 38:** Performances de l'oligoadsorbant avec les échantillons de bière enrichis.

On remarque que les rendements d'oligoextraction de l'OTA des échantillons de bière sont toujours supérieurs à 90% avec de faibles écarts types. Cela montre l'applicabilité de l'oligoadsorbant sur des échantillons réels sans perte de performance due aux effets de matrice. La forte affinité de l'aptamère pour sa cible reste donc stable même dans l'échantillon réel.

Après oligoextraction, que ce soit pour les solutions standards ou les échantillons réels, les pics d'élution de l'OTA dans les chromatogrammes étaient clairs et isolés (**Figure 39**). L'absence d'interférents prouve l'efficacité de l'extraction.



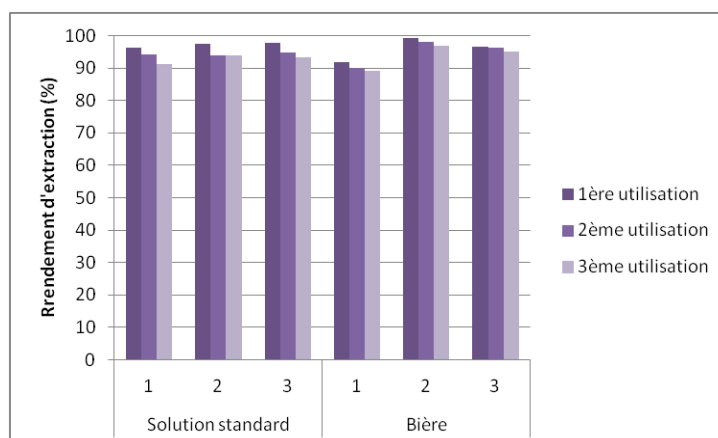


**Figure 39:** Chromatogrammes de CLHP-FD montrant le pic d'éluion de l'OTA (A) d'une solution standard (2ng/mL) et (B) d'un échantillon de bière enrichi à 2 ng/mL d'OTA.

## V.2 Réutilisabilité des oligoadsorbants

Les oligoadsorbants mis au point ont été utilisés une seconde et une troisième fois afin d'évaluer leur capacité de régénération. Entre deux utilisations, les colonnes d'extraction ont été régénérées par 5 mL de tampon de sélection.

La **Figure 40** montre les rendements d'extraction de la 2<sup>ème</sup> et la 3<sup>ème</sup> utilisation dans le tampon et la matrice alimentaire (bière). Trois concentrations d'OTA ont été testées; 1, 2 et 3 ng/mL. Les rendements d'extraction sont stables pendant les trois utilisations et la perte de performance est de 0 à 5%. Ainsi, les oligoadsorbants, conservés à 4°C, ont été utilisés plusieurs fois pendant plus d'un an avec des rendements supérieurs à 90%.

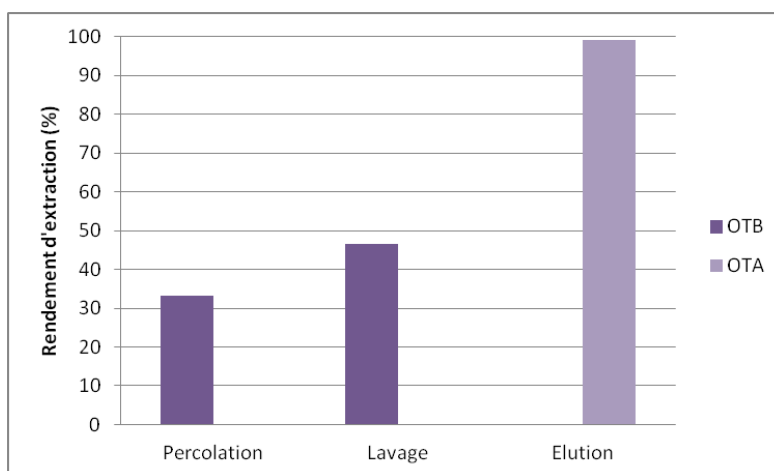


**Figure 40:** Contrôle de la performance de l'oligoadsorbant après trois utilisations sur les solutions standards et la bière.

Les résultats obtenus prouvent que les oligoadsorbants peuvent être régénérés facilement avec du tampon de sélection. Ils sont donc réutilisables sans perte significative de performance et l'activité de l'aptamère reste stable et régénérable jusqu'à un an.

### V.3 Oligoextraction de l'OTB

Finalement, l'oligoadsorbant a été évalué en termes de sélectivité. Pour cela, l'analogue déchloré de l'OTA a été choisi comme analyte non spécifique. Les colonnes d'extraction mises au point ont été donc testées sur des échantillons de bière enrichis d'OTB (Santa Cruz Biotechnology, Allemagne) et d'OTA à 2 ng/mL vu que la structure de l'OTB est très proche de celle de l'OTA. La comparaison des deux profils d'élution obtenus est présentée dans la **Figure 41**.



**Figure 41:** Comparaison des profils d'élution de l'OTB et l'OTA par l'oligoadsorbant.

La fraction de percolation contient 33% de la quantité de l'OTB et ne contient pas d'OTA, 63% de l'OTB percolée était décrochée pendant l'étape de lavage. Cependant, presque toute la quantité de l'OTA (99%) a été décrochée à l'étape d'élution. Cela montre la bonne rétention de l'OTA par le support et la non rétention de l'OTB qui était décrochée dans les premières étapes. On confirme donc la sélectivité de la méthode et la spécificité de l'aptamère pour sa cible: l'OTA.

Contrairement à l'oligoadsorbant développé, il est connu que les colonnes d'immunoaffinité reconnaissent l'OTB. En présence de fortes concentrations d'OTB, l'extraction de l'OTA n'est pas complète [226].

## **V.4 Oligoadsorbants *versus* colonnes d'immunoaffinité**

Vu que la méthode la plus utilisée pour l'extraction de l'OTA des matrices alimentaires est basée sur les immunoadsorbants. Les colonnes à base d'aptamères développées ont été comparées avec des colonnes d'immunoaffinité commerciales de R-Biopharm. Les deux adsorbants ont été comparés de point de vue performance et capacité de régénération. Pour cela, une oligoextraction et une immunoextraction ont été réalisées sur des solutions standards d'OTA et des échantillons de bière enrichis en OTA à des concentrations de 1, 2 et 3 ng/mL. Afin d'évaluer leur réutilisabilité, chaque colonne d'extraction a été utilisée trois fois et la perte de performance a été calculée. Le résumé les rendements d'extraction obtenus pour chaque colonne pendant les trois utilisations ainsi que la perte de performance.

Pendant la première utilisation, les rendements d'extraction des deux adsorbants sont supérieurs à 90%. La capacité de rétention de notre oligoadsorbant est donc similaire à celle des immunoadsorbants, ce qui valide la méthode développée. Cependant, du point de vue régénération, les rendements d'extraction des oligoadsorbants étaient stables pendant les trois utilisations et ils étaient supérieurs à 91% pour toutes les matrices et les concentrations d'OTA, sauf pour une seule colonne où le rendement d'extraction était 89% dans la troisième utilisation puisque il était plus faible dès la première utilisation (91%). Tandis que les IACs perdent leur activité dès la deuxième utilisation où les rendements d'extraction étaient inférieurs à 80% et entre 3,50 et 57,89% après la troisième utilisation.

Dans le cas de l'oligoadsorbant, la perte de performance entre la première et la troisième utilisation était presque 5%, par contre après trois utilisations, la perte de performance des IACs, observée dès la deuxième utilisation, était entre 30 et 95%. Les immunoadsorbants ne peuvent donc pas être régénérés et sont bien des colonnes à usage unique.

En comparant la réutilisabilité de l'oligoadsorbant aux IACs, on constate ici que la capacité de reconnaissance des aptamères peut être régénérée en quelques minutes alors que la régénération de la conformation native active des anticorps demande plusieurs jours voire plusieurs semaines après la dénaturation, certainement à cause de leur nature protéique.

**Tableau 8: Contrôle des performances des oligoadsorbants et des IACs après trois utilisations**

	Concentration (ng/mL)	Rendements d'extraction (%)			Perte de performance (%)
		1 <sup>ère</sup> utilisation	2 <sup>ème</sup> utilisation	3 <sup>ème</sup> utilisation	
<b>Oligoadsorbant</b>	Solution standard				
	1	96,21	94,08	91,15	5,06
	2	97,48	93,89	93,84	3,64
	3	97,67	94,78	93,38	4,29
	Bière				
	1	91,84	90,03	89,03	2,81
	2	99,21	98,03	96,95	2,26
	3	96,43	96,21	94,97	1,46
	<b>IAC Ochraprep</b>	Solution standard			
1		95,05	80,20	57,89	37,16
2		95,31	48,18	28,83	66,48
3		98,07	59,59	10,70	87,37
Bière					
1		95,76	67,75	13,41	77,35
2		98,50	58,35	3,50	95,00
3		98,63	30,40	16,42	82,21

Il est démontré dans ce travail que les aptamères présentent une très bonne alternative aux anticorps. Ils sont des candidats potentiels comme éléments de reconnaissance robustes dans les méthodes analytiques. Les aptamères possèdent une très bonne affinité pour leurs molécules cibles. Cela est dû à leur capacité de se replier en une structure tridimensionnelle bien définie après la fixation de leur cible. De plus, les aptamères sont des molécules stables dans certaines conditions de pH et température car, contrairement aux anticorps qui sont produits par immunisation animale, les aptamères sont synthétisés chimiquement. Pendant la synthèse chimique, des modifications peuvent être introduites dans le but d'améliorer la stabilité, l'affinité, la sélectivité et la spécificité des aptamères. Par ailleurs, ils présentent une bonne tolérance aux solvants ce qui facilite leur régénération après dénaturation.

# Conclusion

Dans cette étude, les avantages des aptamères et leur utilisation dans le développement des outils d'extraction sélective des mycotoxines à partir des matrices complexes ont été soulignés. Cet outil d'extraction, qu'on appelle oligoadsorbant, consiste à une colonne d'affinité à base d'un aptamère anti-OTA immobilisé sur un support de sépharose. En passant l'échantillon alimentaire, la cible est accrochée sur le support, un simple lavage permet d'éliminer les impuretés, et à la fin l'OTA est éluée par une solution de décrochage et quantifiée par CLHP-FD. La comparaison de notre système aux colonnes Ochraprep commerciales nous a permis de confirmer la performance des oligoadsorbants ainsi que leur capacité de régénération et leur stabilité pendant plus d'un an contrairement aux IACs qui sont des colonnes à usage unique.

En considérant ces avantages, les résultats ont confirmé que l'utilisation des aptamères constitue une très bonne alternative aux IACs.

## *Chapitre 3*

# *Développement d'un aptacapteur couplé à un système à flux pour la détection en ligne de l'ochratoxine A*

# Introduction

Dans ce chapitre, une méthode de détection de l'OTA dans les matrices alimentaires est décrite. L'objectif principal de cette partie du travail est de développer un biocapteur à base d'aptamère. Les avantages des aptamères décrits dans le chapitre précédent ont été combinés aux avantages de la technique de l'analyse de flux par injection afin de développer le premier aptacapteur automatisé par un système de flux pour la détection en ligne de l'OTA. Une autre technique prometteuse a été explorée dans la mise au point du biocapteur, la technique des billes magnétiques a été utilisée pour l'immobilisation des biomolécules grâce à la surface spécifique élevée des billes magnétiques et leur capacité d'immobiliser un grand nombre de biomolécules. L'aptacapteur développé est basé sur la technique de compétition où deux formats ont été utilisés, le format compétitif direct et indirect. Dans le format direct, l'aptamère spécifique de l'OTA a été immobilisé sur des billes magnétiques carboxyles et les billes modifiées ont été immobilisées à la surface d'une électrode en carbone sérigraphiée placée dans une cellule de flux et connectée à un potentiostat. L'OTA présente dans l'échantillon entre en compétition avec l'OTA marquée avec la phosphatase alcaline (PAL) pour se lier à l'aptamère immobilisé. Tandis que dans le format indirect, l'OTA est immobilisée sur les billes aminées. La compétition aura lieu entre l'OTA immobilisée et l'OTA libre présente dans l'échantillon alimentaire pour se lier à l'aptamère marqué avec la PAL. L'injection du substrat de la PAL permet la génération du signal qui est proportionnel à la quantité d'OTA dans l'échantillon. Après validation de la méthode, l'aptacapteur a été testé sur des échantillons de bière sans effets de matrice et sans perte de performance.

## I. Présentation des électrodes utilisées

Des électrodes SPCE (Screen Printed Carbon Electrodes) ou électrodes de carbone sérigraphiées ont été utilisées dans ce travail. Il s'agit d'un système à trois électrodes: une électrode de référence (Ag/AgCl), une électrode de travail et une électrode auxiliaire en graphite. La technique de fabrication consiste à superposer différentes couches sur un support solide en PVC transparent, en utilisant une machine à sérigraphier. L'impression est réalisée en faisant passer la pâte à l'aide d'une raclette à travers les mailles de dimensions déterminées

d'un tamis synthétique (polyester) ou métallique (acier inoxydable). La pâte est déposée uniformément sur le support placé sur la table mobile de la machine à sérigraphier.

Les différentes étapes de fabrication sont les suivantes (**Figure 42**):

- Dépôt d'une couche conductrice d'argent,
- Dépôt d'une couche de carbone qui couvre la partie inférieure des électrodes et permet une meilleure adhésion des couches suivantes,
- Dépôt de la pâte de Ag/AgCl sur l'emplacement de l'électrode de référence,
- Dépôt d'une couche isolante entre les électrodes et les contacts,
- Dépôt sur l'électrode de travail d'une pâte de graphite contenant un médiateur.

Entre chaque étape, les électrodes sont séchées à l'étuve à 60°C pendant 30min.

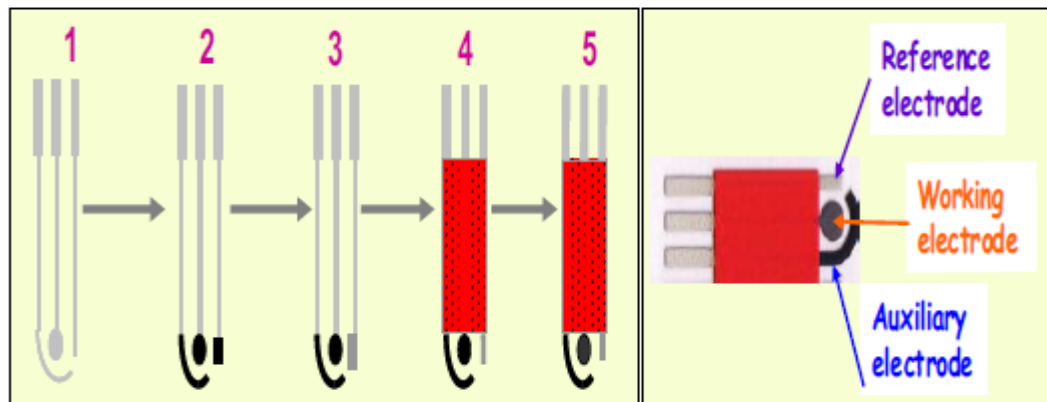


Figure 42: Etapes de fabrication des électrodes de carbones sérigraphiées.

Reference electrode=Electrode de référence, Working electrode=Electrode de travail, Auxiliary electrode=Electrode auxiliaire.

## II. Synthèse des conjugués

### II.1 Réactifs

- Aptamère 1.12.1 anti-OTA amino-modifié en 5' dont la séquence est: 5'-GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGAGCATCGGACA-3', (Eurogentec, Angers, France);



- Ochratoxine A (OTA) de *A.Ochraceus*, (Sigma-Aldrich Saint-Quentin, Fallavier, France);
- Tampon phosphate (PBS) (8g de NaCl, 0,2g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,13 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0,2g de KCl dans 1L d'eau distillée), (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- Tampon de fixation «Binding buffer» (BB) (PBS 1x, MgCl<sub>2</sub> 1mM), (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- Tampon MES 25 mM (2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid), (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- Tampon Tris-Tween (TT), (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- Tampon Tris-EDTA (TE), (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- Albumine Bovine Sérique (BSA), diéthanolamine (DEA), 1-naphthyl phosphate (1-NP), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), *N*-(3-diméthylaminopropyle)-*N*'-éthylecarbodiimide hydrochloride (EDC), Avidine marquée par la Phosphatase ALcaline (Av-PAL), (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France);
- EZ-link amine-PEO<sub>3</sub>-biotine,(Pierce, France);
- Ochratoxine B (OTB), de (*A. ochraceus*), (Santa Cruz Biotechnology, Allemagne);
- Billes magnétiques dynabeads 'My one' carboxyles ou 'M-270' amines (Invitrogen, Etas unis).

## II.2 Biotinylation de l'OTA

Le conjugué OTA-biotine a été synthétisé selon une procédure adaptée de celle décrite par Pierce pour l'utilisation de «EZ-link amine-PEO<sub>3</sub>-biotine». La procédure a été décrite par Prieto-Simon *et al* [197]. 400 µL d'une solution à 34 mM de EDC et NHS ont été ajoutés goutte à goutte à 200 µL d'une solution à 2,5 mg/mL d'OTA préparée dans un tampon MES 0,1M, pH 5,5. Le mélange OTA-EDC-NHS a été laissé sous agitation une heure à température ambiante. Après, 250 µL d'une solution à 50 nM de «EZ-link amine-PEO<sub>3</sub>-biotine» ont été ajoutés au mélange et agités 24 heures à température ambiante. Le mélange de la réaction est par la suite transféré dans une chambre de dialyse (Float-A-Lyzer), dont le seuil de coupure est 500 MWCO (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France), et est dialysé plusieurs fois dans un tampon carbonate 0,05 M et finalement dans l'eau distillée. L'OTA biotylée est conservée à 4°C.

## **II.3 Modification des billes magnétiques carboxyles avec l'aptamère amino-modifié**

Les billes magnétiques 'My one' modifiées avec un groupement carboxyle sont utilisées comme un support solide d'immobilisation de l'élément de reconnaissance du biocapteur; l'aptamère. Ces billes sont facilement activées avec un carbodiimide pour la liaison au groupement amine de l'aptamère modifié. 500 nM d'aptamère amino-modifié préparés dans le tampon de fixation ont été préchauffés à 94°C pendant 5 minutes avec un Thermocycler de Eppendorf (Le Pecq, France) et laissés à température ambiante pendant 20 minutes. Puis, l'aptamère a été immobilisé sur les billes magnétiques selon une procédure adaptée de celle de Invitrogen et Barthelmebs *et al* [213]. Les billes sont lavées deux fois avec une solution à 25 mM de MES et incubées avec l'aptamère renaturé pendant 30 minutes à température ambiante. L'EDC a été ensuite ajouté, afin d'activer les groupements carboxyles des billes magnétiques. La liaison amine entre le groupement amine de l'aptamère et les groupements carboxyles des billes magnétiques se forment sous agitation moyenne pendant la nuit à température ambiante à l'aide d'un HulaMixer sample mixer de Invitrogen (USA). Les billes magnétiques ont été par la suite lavées avec le tampon Tris-Tween (TT) trois fois. Les billes sont incubées avec le TT pendant 30 minutes à chaque lavage afin de bloquer les groupements carboxyles n'ayant pas réagi. Finalement, les billes modifiées ont été mises en suspension dans un tampon Tris-EDTA (TE) et conservées à 4°C.

Des billes magnétiques de contrôle ont été préparées selon la même procédure sans addition de l'aptamère.

## **II.4 Modification des billes magnétiques aminées avec l'OTA**

Les billes magnétiques 'M-270' modifiées avec un groupement amine sont utilisées comme un support solide d'immobilisation de l'OTA. Ces billes sont facilement activées avec le mélange EDC/NHS pour établir une liaison covalente avec le groupement carboxyle de l'OTA. Les billes magnétiques sont lavées trois fois avec du PBS puis incubées avec l'OTA et le mélange EDC/NHS pendant une nuit à température ambiante. Le mélange EDC/NHS sert à activer le groupement carboxyle de l'OTA. La réaction a été ensuite stoppée avec une solution

à 30 mM de glycine et les billes ont été lavées trois fois avec du PBS afin de saturer les résidus non liés. Finalement, les billes modifiées ont été remises en suspension dans du PBS et conservées à 4°C.

Des billes magnétiques de contrôle ont été préparées selon la même procédure sans addition de l'OTA.

### III. Présentation du système automatisé à flux

Le schéma du système en flux est présenté dans la **Figure 43**. Ce système consiste en une cellule de flux attachée à un support magnétique pour fixer les billes magnétiques. Cette cellule contient une chambre qui maintient l'électrode dans le système. La cellule de flux est connectée à une pompe à seringue bidirectionnelle (Cavro XLP6000) et à un potentiostat (Polarostat type PRGE, Tacussel électronique).

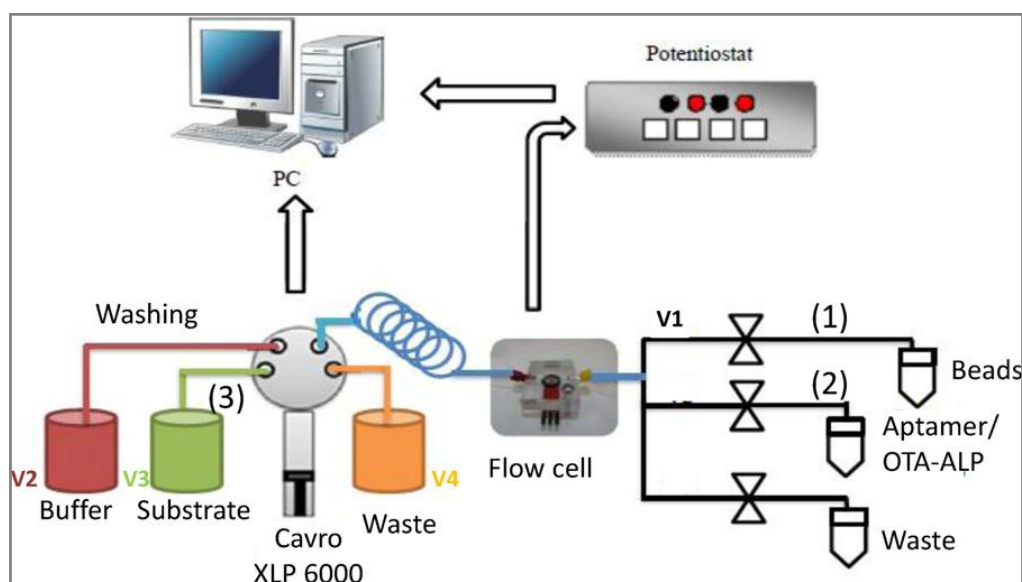


Figure 43: Schéma du système d'injection et la cellule de flux utilisés dans l'automatisation de l'aptacpteur de l'OTA.

Washing=Lavage, Buffer=Tampon, Substrate=Substrat, Waste=poubelle, Flow cell= Cellule de flux, Beads=Billes.

La cellule de flux est fabriquée en polyméthyle méthacrylate. Un aimant de 4 mm de diamètre attaché à la chambre centrale a été utilisé pour immobiliser les billes magnétiques modifiées sur la surface de l'électrode. Afin de prévenir les contaminations dans la cellule de

flux, une bobine de 200  $\mu\text{L}$  a été laissée entre la pompe et la cellule. L'entrée et la sortie des solutions ont été orientées de haut vers le bas à l'entrée de la cellule pour faciliter le meilleur flux des solutions sur la surface de l'électrode.

Dans le système automatisé à flux, tous les paramètres tels que; le temps d'incubation, les étapes de lavage, les volumes, le flux, les mesures et les enregistrements des signaux ont été automatiquement contrôlés par une interface graphique personnalisée développée sous LABVIEW 8,5. Tous les réactifs sont injectés par la pompe bidirectionnelle contenant quatre vannes. La vanne 1 (V1) a été utilisée pour injecter les billes magnétiques modifiées, l'aptamère et l'OTA. La V2 a été utilisée pour laver l'électrode et la seringue. Le substrat a été injecté par la V3 et les pertes sont éliminées par la V4.

Le système était programmé et toutes les étapes ont été effectuées à l'aide de séquences automatiques. De plus, le programme permet la modification des différents paramètres comme les vitesses, les temps d'incubation, les volumes aspirés et injectés et les vannes utilisées dans chaque étape. Les mesures ampérométriques ont été réalisées en utilisant une carte d'acquisition (PMD1208FS), connectant le potentiostat à l'ordinateur pour l'acquisition du signal.

## **IV. Les formats utilisés**

Vue la petite taille de l'OTA, on ne peut pas utiliser un format sandwich pour la détection de l'OTA. Pour cela, un format compétitif direct et un format compétitif indirect ont été testés.

Avant utilisation, les électrodes sérigraphiées ont été soumises à un prétraitement électrochimique avec 5 balayages de voltamétrie cyclique entre 1,0 et -1,5 V dans une solution à 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Un potentiostat Autolab PGSTAT12 (Metrohm, France) a été utilisé dans le prétraitement des électrodes.

### **IV.1 Aptacapteur compétitif direct en flux**

Afin d'éviter les adsorptions non spécifiques, une étape de blocage des électrodes a été effectuée en déposant 100  $\mu\text{L}$  de BSA 2% sur chaque électrode pendant une heure.

L'électrode a été ensuite introduite dans la cellule de flux attachée à l'aimant et connectée à un potentiostat. Une solution de 2  $\mu\text{L}$  des billes magnétiques-aptamère diluées dans du tampon de fixation a été injectée sur la surface de l'électrode. Des mélanges contenant une concentration fixe d'OTA-biotine et des concentrations prédéterminées d'OTA libre préparées dans le tampon ou dans l'échantillon réel ont été ensuite injectés. L'OTA libre et l'OTA biotinylée entrent en compétition pour se fixer sur l'aptamère immobilisé. Un conjugué de streptavidine marquée à la phosphatase alcaline a été ensuite injecté pour se lier à l'OTA biotine reconnue par l'aptamère. Après plusieurs temps d'incubation testés, le temps d'incubation utilisé dans chaque étape était 10 minutes. Finalement, une solution de 1-naphtyl phosphate (1-NP) (4 mg/mL) préparée dans un tampon DEA (Diéthanolamine) pH 9,5 a été injectée. La génération du signal a été basée sur la déphosphorylation du substrat non électroactif 1-NP par la phosphatase alcaline, suivie par l'oxydation du produit électroactif 1-naphtol en 1-iminoquinone sur la surface de l'électrode. Le lavage a été réalisé automatiquement en utilisant une solution de PBS-tween (0,05 %) après chaque étape.

## **IV.2 Aptacapteur compétitif indirect en flux**

Les sites non spécifiques de la surface des électrodes ont été bloqués avec 100  $\mu\text{L}$  de BSA 2% pendant une heure. Puis, 4  $\mu\text{L}$  de billes magnétiques modifiées avec l'OTA diluées dans du tampon de fixation ont été injectées sur la surface de l'électrode. Une solution à 150 nM d'aptamère biotinylé et différentes concentrations d'OTA préparées dans le tampon ou dans l'échantillon réel ont été ensuite passés. L'OTA libre entre donc en compétition avec l'OTA immobilisée sur la surface de l'électrode pour se lier à l'aptamère biotinylé. Une solution d'avidine-PAL a été par la suite injectée où l'avidine se lie à la biotine de l'aptamère. Finalement, le substrat de la PAL a été injecté afin de réaliser la détection électrochimique telle qu'elle a été décrite dans le paragraphe précédent.

## **V. Détection ampérométrique de l'OTA**

La mesure de l'activité de la PAL, l'enzyme qui marque l'OTA ou l'aptamère, a été réalisée par ampérométrie. Le substrat de la PAL (1-NP) a été injecté sur l'aptacapteur intégré dans la cellule de flux connectée au potentiostat. Après incubation du substrat pendant 6

minutes, un potentiel de 200 mV a été appliqué. Ce potentiel correspond au potentiel d'oxydation du produit 1-naphtol en 1-iminoquinone.

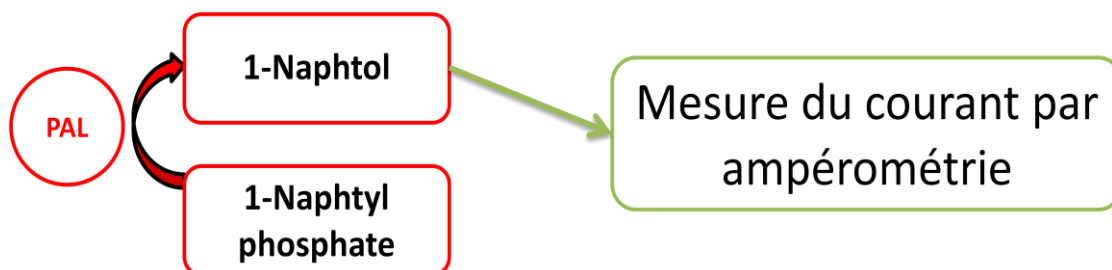


Figure 44: Principe de la détection électrochimique de l'OTA.

Le signal obtenu est proportionnel à l'activité enzymatique de la PAL. Il est donc inversement proportionnel à la quantité d'OTA dans le milieu.

## VI. Préparation des échantillons réels: la bière

La bière a été choisie comme échantillon réel, afin de valider la méthode de détection développée. Pour cela, les échantillons ont été préparés selon la procédure décrite dans le chapitre précédent.

## VII. Résultats et discussion

### VII.1 Optimisation des paramètres du système à flux

La réaction biochimique peut dépendre de plusieurs facteurs analytiques qui doivent être considérés, car les conditions de réaction dans le cas d'un aptacapteur automatisé à flux sont différentes de celles d'un aptacapteur conventionnel «en batch». Avant l'utilisation du système à flux pour la détection en ligne de l'OTA, les paramètres pouvant influencer la sensibilité et l'efficacité de l'aptacapteur ont été optimisés et validés.

Vu que notre système automatisé à flux peut être utilisé en flux continu ou stoppé, les deux procédures ont été appliquées à l'aptacapteur. Toutes les réactions et les lavages ont été effectués à l'aide d'une pompe à seringue où le flux continu a été utilisé pour les étapes de lavage et l'injection du substrat, tandis que le flux stoppé a été choisi pour assurer une meilleure interaction aptamère-OTA. Le débit des échantillons et des réactifs est la principale variable instrumentale, des variations du débit peuvent améliorer les performances analytiques comme la gamme de linéarité et la sensibilité. Un débit très élevé peut détruire ou déplacer les billes magnétiques de la surface de l'électrode provoquant ainsi une fluctuation dans la réponse de l'aptacapteur, alors qu'un débit très faible peut augmenter le temps de réaction entraînant un retard de signal. Afin d'atteindre la meilleure sensibilité, plusieurs expériences ont été réalisées en utilisant différents débits. Les conditions qui ont montré la meilleure

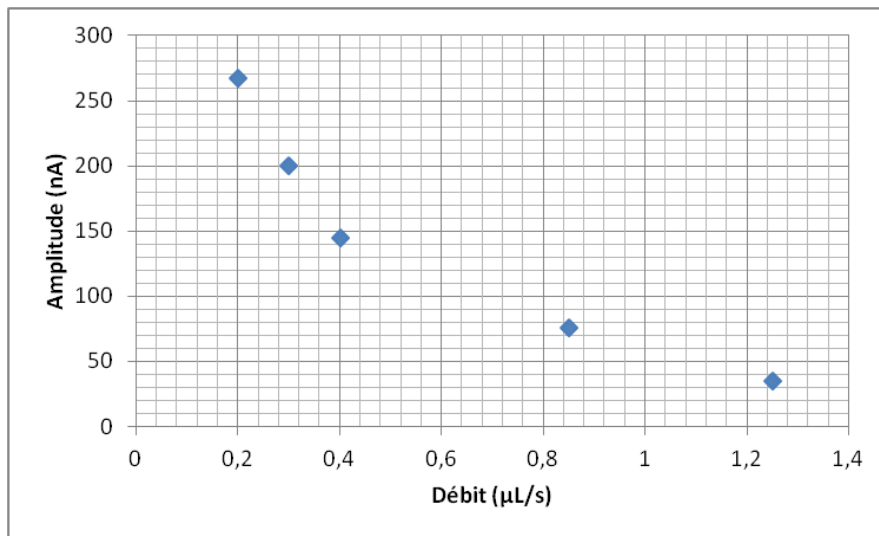


Figure 45: Effet du débit sur la performance de l'aptacapteur à un potentiel appliqué de 200 mV vs Ag/AgCl.

corrélation entre le signal et la vitesse de la pompe à seringue bidirectionnelle sont présentées dans le

et l'effet des différents débits sur la performance de l'aptacapteur est décrit dans la Figure 45.

Tableau 9: Paramètres optimisés pour l'aptacapteur automatisé en flux

Débit d'injection des billes	0.20 $\mu\text{L/s}$
Flux stoppé	10 min
Débit d'injection du substrat	1.6 $\mu\text{L/s}$
Débit de lavage	0.83 $\mu\text{L/s}$

D'après les résultats d'optimisation, on remarque que la réponse de l'aptacapteur est inversement proportionnelle au débit d'injection des billes. Une vitesse d'injection très élevée empêche les billes magnétiques de s'immobiliser au support magnétique attaché à la cellule de flux ce qui diminue le signal et influence la reproductibilité de l'aptacapteur. Un débit de 0,2  $\mu\text{L/s}$  a été donc utilisé pour injecter les billes sur la surface des électrodes.

Pour chaque étape de caractérisation de l'aptasensor, le débit permettant d'avoir la meilleure réponse a été sélectionné. Cela remonte aux avantages du système de flux utilisé où le débit et le temps de flux sont contrôlables.

## **VII.2 Aptacapteur compétitif direct**

### **VII.2.1 Optimisation de la procédure de l'essai compétitif direct**

Afin de valider les méthodes d'immobilisation et de détection, des essais compétitifs directs ont été réalisés en flux. L'essai direct est basé sur l'immobilisation des billes magnétiques modifiées avec l'aptamère sur la surface de l'électrode. L'OTA biotinylée est par la suite injectée avec l'OTA libre, ces dernières entrent donc en compétition pour se lier aux sites de fixation disponibles sur l'aptamère immobilisé. Finalement, le conjugué Avidine-PAL a été utilisé pour réaliser la détection électrochimique. Dans les conditions instrumentales optimisées, la réponse électrochimique de l'aptasensor dépend de la formation du complexe aptamère-OTA sur la surface de l'électrode, et l'activité enzymatique est inversement proportionnelle à la concentration de l'OTA dans l'échantillon (**Figure 46**).



En premier lieu, plusieurs paramètres expérimentaux ont été optimisés tels que le volume des billes magnétiques, les dilutions de l'OTA biotinylée, la quantité du conjugué Avidine-PAL ainsi que le temps de réaction du complexe aptamère-OTA. Pour cela, plusieurs essais ont été réalisés sans OTA libre et donc sans étape de compétition. Ces essais ont été effectués selon le principe montré dans la **Figure 46** en utilisant l'OTA biotinylée seule. Des essais de contrôle ont été réalisés avec des billes magnétiques sans aptamère pour évaluer les interactions non spécifiques. Les conditions expérimentales donnant la meilleure différence entre le contrôle et le test ont été sélectionnées.

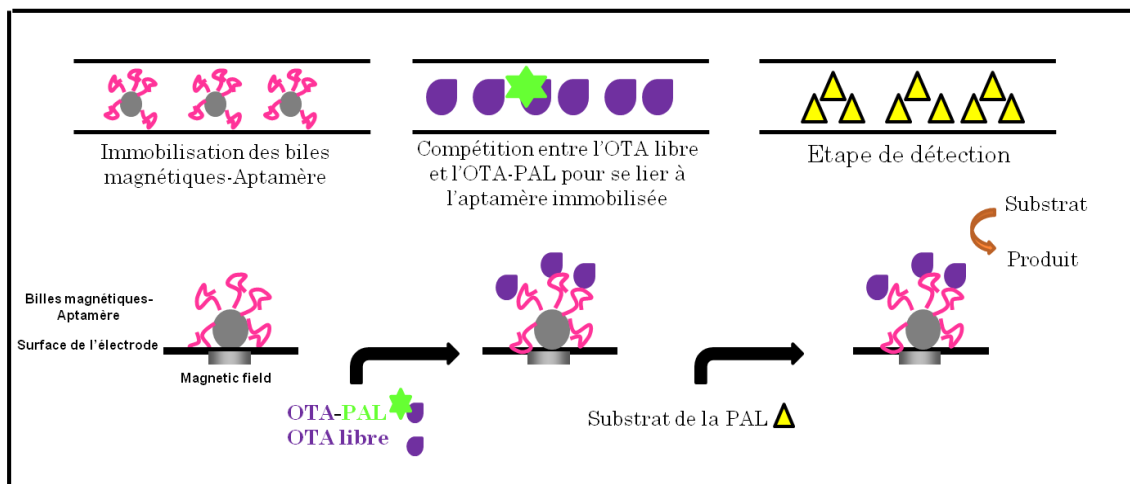


Figure 46: Présentation schématique du principe de l'aptacapteur compétitif direct en flux.

### VII.2.1.1 Optimisation du volume des billes magnétiques-aptamère

Afin de trouver la quantité optimale des billes-aptamère, plusieurs volumes de billes variant de 1 à 3  $\mu\text{L}$  ont été étudiés. Pour chaque volume de billes, un test à base de billes modifiées avec l'aptamère et un contrôle à base de billes non modifiées ont été réalisés. La **Figure 47** montre la réponse obtenue pour chaque volume de billes dans les deux cas du contrôle et de test.

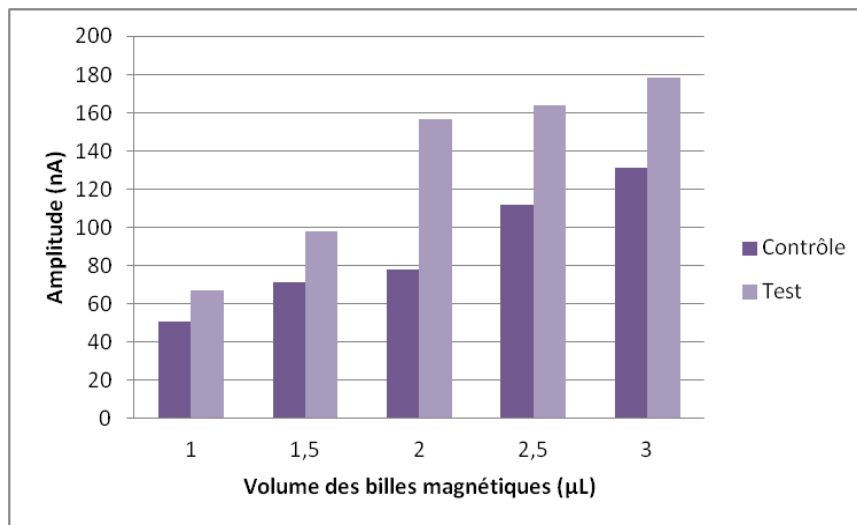


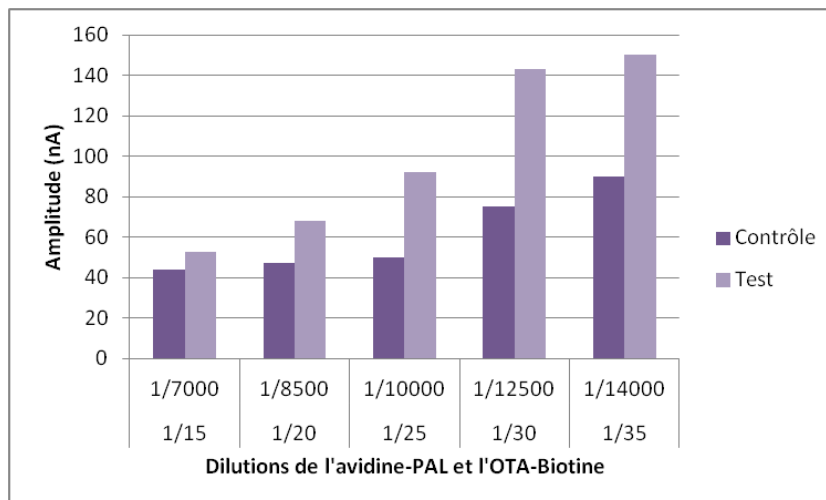
Figure 47: Effet du volume des billes magnétiques-aptamère sur la performance de l'aptacapteur compétitif direct.

Les résultats démontrent que la meilleure différence entre le contrôle et le test a été obtenue en utilisant 2 µL de billes magnétiques. Bien que la réponse de l'aptacapteur est proportionnelle à la concentration de l'aptamère immobilisé et donc au volume de billes, un volume élevé de billes peut diminuer la sensibilité du système en augmentant l'amplitude du contrôle et le bruit de fond, diminuant ainsi la différence entre le contrôle et le test. Par ailleurs, un faible volume de billes peut influencer la gamme de linéarité de l'essai.

### VII.2.1.2 Optimisation des dilutions de l'OTA biotinylée et de l'avidine-PAL

Dans ce travail, la PAL a été utilisée pour marquer l'OTA *via* la forte interaction non covalente avidine-biotine, car cette enzyme présente moins d'adsorption non spécifique par rapport à l'enzyme généralement utilisée: la peroxidase de raifort (HRP).

Les dilutions de l'OTA-biotine et de l'avidine-PAL doivent également être étudiées. Des expériences avec différentes dilutions d'OTA-Biotine et avidine-PAL et un volume fixe de 2 µL de billes magnétiques-aptamère ont été réalisées afin de trouver les dilutions optimales. La **Figure 48** montre la réponse obtenue pour chaque dilution dans les deux cas du contrôle et de test.



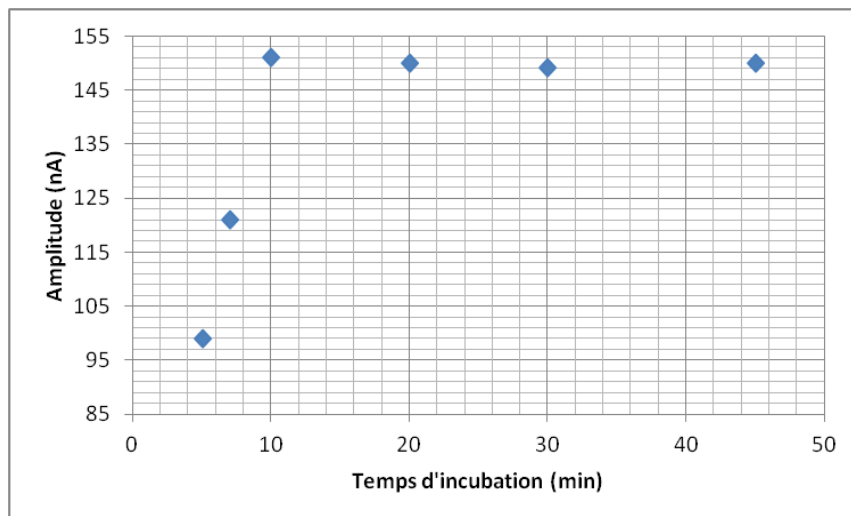
**Figure 48:** Effet des dilutions de l'avidine-PAL et de l'OTA biotine sur les performances de l'aptacapteur compétitif direct.

Pour les faibles concentrations des deux conjugués, on remarque une faible réponse pour le contrôle et le test et une faible différence d'amplitude entre les deux. En utilisant les conjugués à forte concentration, on remarque une amplitude élevée. Pour cela, les dilutions optimales, pour les quelles on obtient la meilleure différence entre le contrôle et le test étaient 1/30 pour l'OTA-biotine et 1/125000 pour l'avidine-PAL. Bien que l'amplitude soit proportionnelle à la concentration de l'OTA marquée, une forte concentration peut influencer la spécificité et la sensibilité de l'aptacapteur. Cela peut être du aux adsorptions non spécifiques de l'OTA et/ou la PAL sur la surface de l'électrode de carbone augmentant ainsi le bruit de fond.

### VII.2.1.3 Optimisation du temps de réaction aptamère-OTA et OTA biotinylée-avidine-PAL

Les temps d'incubation de l'OTA biotinylée et l'avidine-PAL doivent être également optimisés afin de garantir une interaction optimale de l'aptamère avec l'OTA et de l'OTA biotinylée avec l'avidine-PAL. Plusieurs expériences ont été donc réalisées en utilisant différents temps d'analyse à l'aide de la technique de flux stoppé.

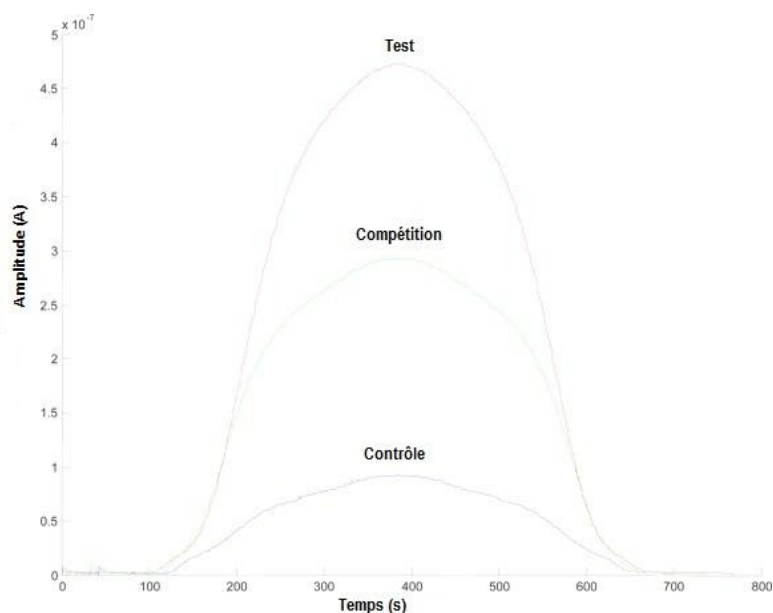
Dans les bioessais à base d'aptamères, le temps d'incubation généralement utilisé varie de 30 à 45 minutes. Ce dernier a été comparé avec des durées plus courtes afin de réduire le temps d'incubation. La **Figure 49** montre la réponse de l'aptacapteur obtenue en faisant varier le temps d'incubation de 5 à 45 minutes.



**Figure 49:** Effet du temps d'incubation de l'OTA-biotine et de l'avidine-PAL sur la performance de l'aptacapteur compétitif direct avec un potentiel appliqué de 200 mV vs Ag/AgCl.

Les résultats obtenus montrent que l'amplitude du signal était proportionnelle au temps d'incubation. Cependant, après 10 minutes, aucune différence de signal n'a été observée. Un temps d'incubation optimum de 10 minutes a été donc sélectionné pour l'aptacapteur direct et indirect. Le temps d'analyse réduit peut être dû à la diminution de la distance de diffusion et à l'augmentation de la surface de réaction dans notre système à flux.

Dans les conditions sélectionnées décrites ci-dessus, la réponse électrochimique du produit enzymatique est proportionnelle à la concentration de l'OTA reconnue par l'aptamère immobilisé sur la surface de l'électrode. Des essais ont été réalisés en injectant les billes-aptamère ou les billes non-modifiées suivies par l'OTA-biotine avec et sans OTA libre, puis l'avidine-PAL. Après injection du substrat et application d'un potentiel de 200 mV vs Ag/AgCl, une acquisition est lancée à l'aide du logiciel LABVIEW pour mesurer l'amplitude du signal en fonction du temps (Figure 50).



**Figure 50:** Variation de l'amplitude du signal en fonction du temps d'incubation du substrat de la PAL.

L'amplitude obtenue lors du test (Billes modifiées et OTA-biotine) était plus élevée que celle obtenue dans la compétition (Billes modifiées et mélange d'OTA-biotine et OTA libre) et le contrôle (Billes non modifiées et OTA-biotine). Ces résultats montrent l'applicabilité de notre système à flux dans la détection de l'OTA.

## **VII.2.2 Performance de l'aptacapteur direct dans le tampon**

Après optimisation de tous les paramètres instrumentaux et expérimentaux, les bioessais compétitifs électrochimiques en flux ont été réalisés en utilisant différentes concentrations d'OTA libre préparées dans du tampon PBS. La présence de l'OTA dans la solution empêche la fixation de l'OTA biotinylée par l'aptamère, entraînant la diminution de l'activité de la PAL et donc la diminution de l'amplitude du signal. La détection électrochimique a été effectuée sur des électrodes de carbone sérigraphiées afin d'augmenter la sensibilité de la méthode. La génération du signal est basée sur la déphosphorylation du substrat non-électroactif de la PAL; 1-naphtyl phosphate, suivie par l'oxydation du produit électroactif 1-naphtol phosphate en 1-iminoquinone sur la surface de l'électrode. Le signal électrochimique généré a été mesuré par ampérométrie après application d'un potentiel de 200 mV vs Ag/AgCl. La réponse enzymatique obtenue est inversement proportionnelle à la

concentration de l'OTA libre dans la solution. A partir des valeurs obtenues, les pourcentages de fixation ont été calculés (**Équation 1**):

$$\text{Pourcentage de fixation (\%)} = \frac{\text{Compétition} - \text{contrôle}}{\text{Test} - \text{contrôle}} \times 100$$

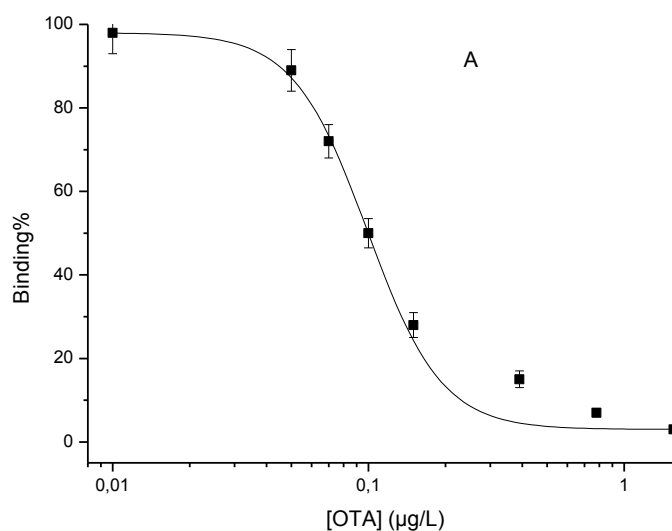
**Équation 1**: Principe du calcul du pourcentage de binding à partir de l'amplitude du signal obtenue dans le cas des billes non modifiées (contrôle) et des billes modifiées en présence (Compétition) ou en absence (Test) d'OTA libre.

Les pourcentages de fixation calculés pour l'aptasensor compétitif direct en flux sont présentés dans le .

**Tableau 10: Pourcentages de fixation obtenus pour chaque concentration d'OTA testée dans le format direct**

Concentration de l'OTA (µg/L)	0,01	0,05	0,07	0,1	0,15	0,39	0,78	1,56
Pourcentage de fixation (%)	98	89	72	50	28	15	7	3

Les pourcentages de fixation obtenus ont été utilisés pour tracer la courbe d'étalonnage (**Figure 51**) à l'aide du logiciel «Origin Pro 8 SRO».



**Figure 51**: Courbe de calibration obtenue pour l'aptacpteur compétitif direct en flux.

Des pourcentages de fixation élevés ont été obtenus en diminuant la concentration de l'OTA libre. Vu que le pourcentage d'erreur est de 5 %, la limite de détection a été considérée comme la concentration d'OTA correspondant à 80 % de pourcentage de fixation de

l'aptamère en se basant sur la valeur maximale de l'écart type. La courbe de calibration a été tracée par une fonction sigmoïdale logistique, une équation à quatre paramètres  $y = y^0 + (a/1+(x/x^0)^b)$ , où a et  $y^0$  sont respectivement les valeurs maximales et minimales, b est la pente du point d'inflexion et  $x^0$  et la valeur x au point d'inflexion.

	A	B	C	D
1	Equation	$y = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^p)$		
2	Adj. R-Square	-1		
3			Value	Standard Error
4	C1	A1	98	--
5	C1	A2	3	--
6	C1	x0	0,09918	--
7	C1	p	3	--

Tableau 11: Tableau récapitulatif des différents paramètres de l'équation sigmoïdale pour le format direct.

#### *Calcul de la limite de détection et IC50*

$$\text{Pourcentage de fixation (\%)} = 3 + \frac{(98 - 3)}{\left(1 + \left(\frac{\text{Limite de détection ou IC50}}{0,09918}\right)^3\right)}$$

Équation 2: Calcul de la limite de détection et IC50 à partir du pourcentage de fixation pour l'essai direct.

Pour la limite de détection, le pourcentage de fixation est de 80% alors que pour le IC50, le pourcentage de fixation est 50%.

Pour l'aptacapteur compétitif direct en flux, une limite de détection de 0,06 µg/L et un IC50 de 0,098 µg/L ont été déterminés.

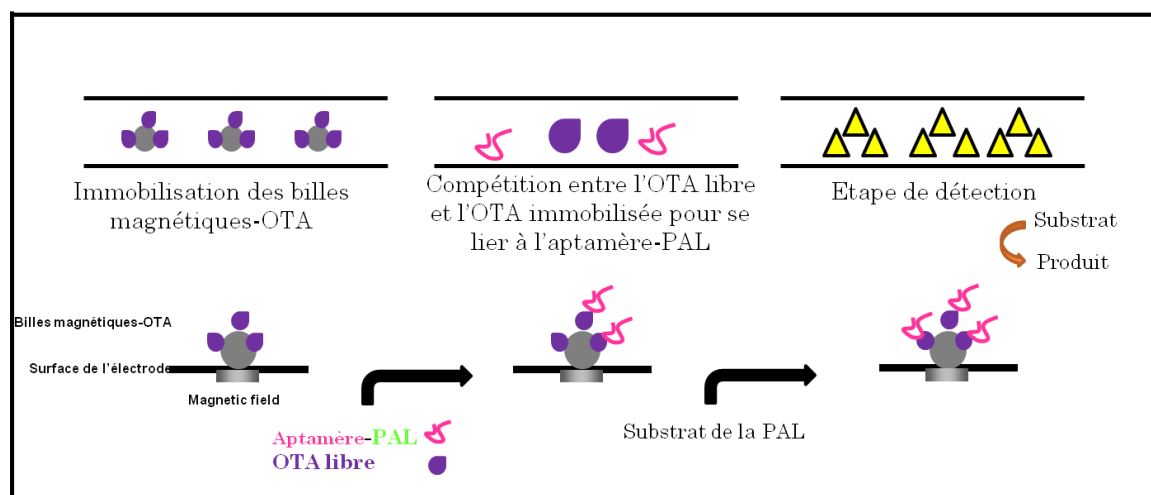
## **VII.3 Aptacapteur compétitif indirect**

### **VII.3.1 Optimisation de la procédure de l'essai compétitif indirect**

L'essai indirect est basé sur l'immobilisation des billes magnétiques modifiées avec l'OTA sur la surface des électrodes. La compétition aura lieu par la suite entre l'OTA

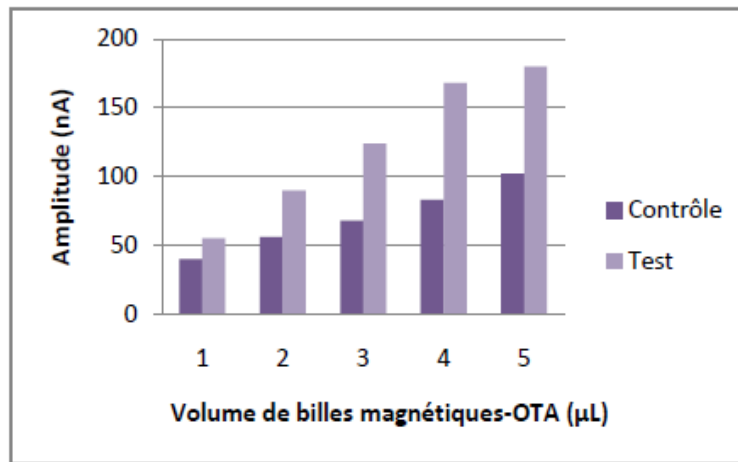
immobilisée et l'OTA libre en solution pour se lier aux sites spécifiques de l'aptamère biotinylé en solution. Ensuite, le conjugué avidine-PAL a été utilisé pour réaliser la détection électrochimique. Dans les conditions instrumentales optimisées, la réponse électrochimique de l'aptasenseur dépend de la formation du complexe aptamère-OTA sur la surface de l'électrode, et l'activité enzymatique est inversement proportionnelle à la concentration de l'OTA dans l'échantillon (**Figure 52**).

Différents paramètres expérimentaux ont été optimisés en absence d'OTA libre comme il a été décrit pour le format compétitif direct. Vu que les bioessais à base d'aptamères sont basés sur la formation du complexe aptamère-cible, la concentration de l'aptamère et la concentration de l'OTA sont des facteurs clés pour l'aptacapteur compétitif indirect en flux. Premièrement, la concentration de l'OTA a été optimisée en utilisant différents volumes de billes magnétiques-OTA. Pour cela, plusieurs volumes de billes variant de 1 à 5  $\mu\text{L}$  ont été étudiés. Pour chaque volume de billes, un test à base de billes modifiées avec l'OTA et un contrôle à base de billes non modifiées ont été réalisés. La **Figure 53** montre les réponses obtenues pour chaque volume de billes dans les deux cas du contrôle et de test.



**Figure 52:** Présentation schématique du principe de l'aptacapteur compétitif indirect en flux.

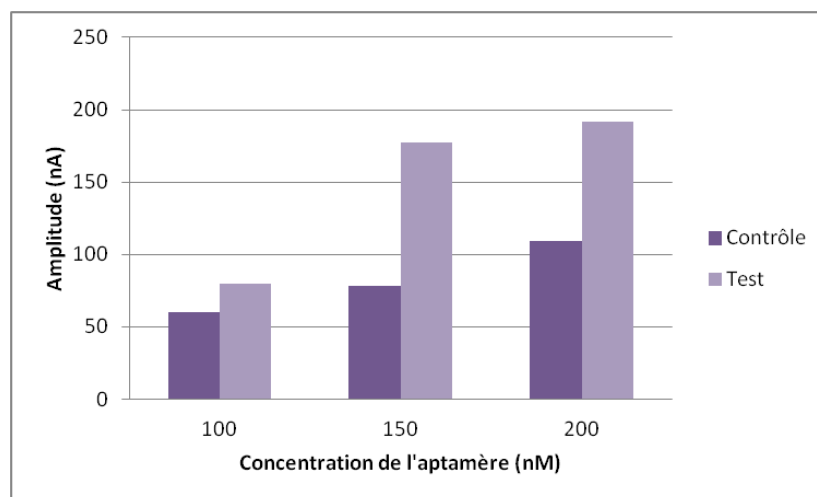




**Figure 53:** Effet du volume des billes magnétiques-OTA sur la performance de l'aptacapteur compétitif indirect.

La **Figure 53** confirme qu'une forte concentration de billes magnétiques-OTA permet d'augmenter l'intensité du signal. Cependant, cela influence la sensibilité de la méthode en occupant la majorité des sites de reconnaissance de l'aptamère, et la spécificité en augmentant le risque d'interactions non spécifiques d'où l'importance du signal de contrôle. Egalement, une faible concentration d'OTA sur la surface de l'électrode peut influencer la sensibilité en réduisant la gamme de linéarité. Le volume de billes-OTA sélectionné a été donc de 4 µL.

La concentration de l'aptamère biotinylé a été par la suite optimisée en réalisant plusieurs expériences avec différentes concentrations d'aptamères variant de 100 à 200 nM.



**Figure 54:** Effet de la concentration de l'aptamère sur la performance de l'aptacapteur compétitif indirect.

La réponse de l'aptacapteur était proportionnelle à la concentration de l'aptamère, mais une forte concentration peut influencer la sensibilité de la méthode en augmentant la limite de détection. En utilisant une forte concentration d'aptamère, le nombre de sites de reconnaissance augmente, ce qui fait que l'intensité du signal sera la même en absence et en présence d'OTA libre. La concentration optimisée d'aptamère était de 150 nM pour laquelle on obtient une gamme de linéarité étroite avec une faible limite de détection.

Comme dans le cas du format compétitif direct, le temps d'incubation optimal trouvé pour le format indirect était de 10 minutes.

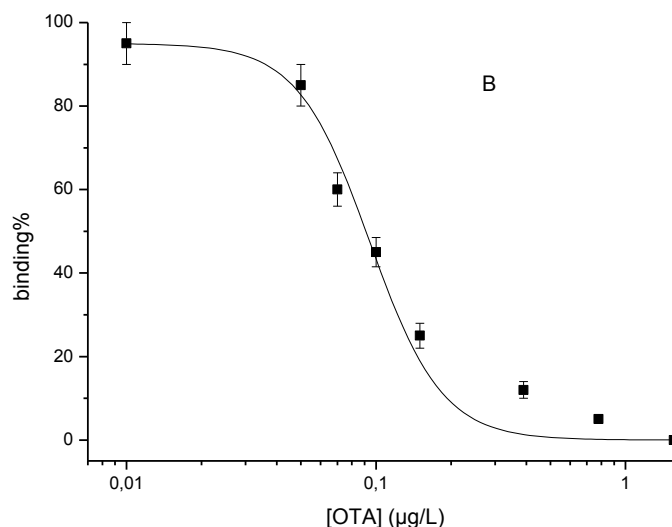
### **VII.3.2 Performance de l'aptacapteur indirect dans le tampon**

Après optimisation de tous les paramètres, un essai compétitif indirect à base d'aptamère a été réalisé dans un système automatisé à flux. L'OTA immobilisée et différentes concentrations d'OTA libre préparées dans du tampon PBS entrent en compétition pour se lier à l'aptamère marqué en solution. La détection électrochimique et le calcul des pourcentages de fixation ont été effectués selon la même procédure décrite pour le format compétitif direct. Un pourcentage d'erreur de 5% a été trouvé pour l'aptacapteur compétitif indirect en flux.

Les pourcentages de fixation obtenus pour l'aptasensor compétitif indirect en flux sont montrés dans le .

Tableau 12: Pourcentages de fixation obtenus pour chaque concentration d'OTA testée dans le format indirect

Concentration de l'OTA ( $\mu\text{g/L}$ )	0,01	0,05	0,07	0,1	0,15	0,39	0,78	1,56
Pourcentage de fixation (%)	95	85	60	45	25	152	5	0



**Figure 55:** Courbe de calibration obtenue pour l’aptacapteur compétitif indirect en flux.

La courbe de calibration (**Figure 55**) a été tracée en utilisant la même fonction sigmoïdale décrite pour le format direct, les paramètres de l’équation sont indiqués dans le .

**Tableau 13:** Tableau récapitulatif des différents paramètres de l’équation sigmoïdale pour le format indirect

	A	B	C	D
1	Equation	$y = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^p)$		
2	Adj. R-Square	-1		
3			Value	Standard Error
4	B	A1	95	--
5	B	A2	0	--
6	B	x0	0,09436	--
7	B	p	3	--

La limite de détection (0,05 µg/L) correspondant à 80% de fixation et le IC50 (0,090 µg/L) correspondant à 50% de fixation ont été calculés à partir de la courbe de calibration comme il a été décrit pour l’aptacapteur direct.

$$\text{Pourcentage de fixation (\%)} = 0 + \frac{(95 - 0)}{\left(1 + \left(\frac{\text{Limite de détection ou IC50}}{0,094}\right)^3\right)}$$

Équation 3: Calcul de la limite de détection et IC50 à partir du pourcentage de fixation pour l'essai indirect.

La limite de détection ainsi que le IC50 obtenus pour l'essai indirect sont plus faibles que ceux obtenus dans le cas de l'essai direct ce qui montre la sensibilité de l'aptacapteur compétitif indirect (0,05 µg/L). La différence de sensibilité entre les deux formats peut être expliquée par le fait que l'avidine possède un point iso-électrique d'environ 10 et qu'elle est chargée positivement à pH 7,4. Cela peut engendrer sa liaison non spécifique aux billes magnétiques carboxyles chargées négativement utilisées pour immobiliser l'aptamère dans le format direct, ce qui n'était pas le cas dans le format direct où des billes magnétiques aminées ont été utilisées comme support d'immobilisation.

Tableau 14: Comparaison entre la sensibilité de l'aptacapteur direct et celle de l'aptacapteur indirect

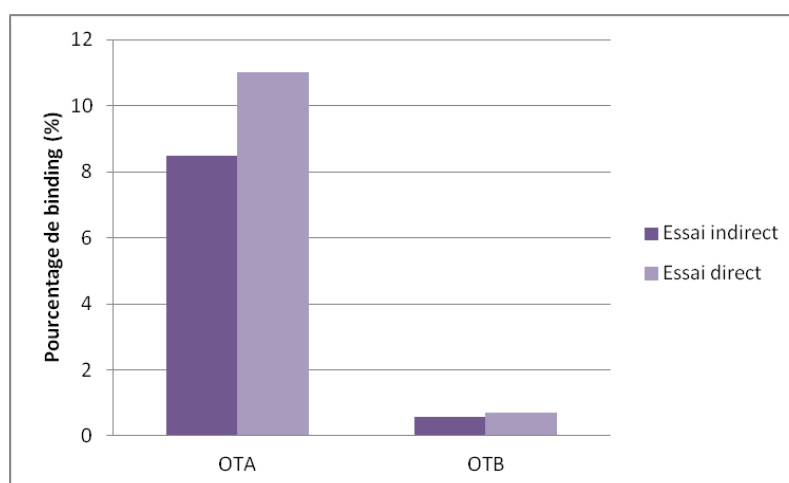
Format	Limite de détection (µg/L)	IC50 (µg/L)	Equation sigmoïdale	R
Essai direct	0,06	0,098	$3 + \frac{(98 - 3)}{\left(1 + \left(\frac{\text{Limite de détection ou IC50}}{0,09918}\right)^3\right)}$	0,99
Essai indirect	0,05	0,090	$0 + \frac{(95 - 0)}{\left(1 + \left(\frac{\text{Limite de détection ou IC50}}{0,094}\right)^3\right)}$	0,99

## VII.4 Reproductibilité et spécificité de l'aptacapteur

La reproductibilité de l'aptacapteur mis au point a été étudiée en évaluant la précision des bioessais. Celle-ci a été évaluée avec la même concentration d'OTA 0,5 µg/L dans les mêmes conditions expérimentales en utilisant trois aptasensors préparés indépendamment. Le coefficient de variation entre les pics obtenus pour chaque essai était de 5%, ce qui montre la précision et la reproductibilité de la méthode de détection proposée. Cette bonne

reproductibilité peut être expliquée par le fait que les billes magnétiques constituent un bon support pour une immobilisation organisée des aptamères et de l'OTA, ce qui améliore la répétabilité de l'aptacapteur.

Afin de confirmer que le changement dans le pourcentage de fixation était basé essentiellement sur l'interaction spécifique de l'aptamère avec sa cible l'OTA, et non pas à une adsorption non-spécifique de l'OTA sur la surface de l'électrode. L'aptacapteur a été incubé avec une concentration définie de 0,5 µg/L d'OTB, l'analogue déchloré de l'OTA, comme analyte non spécifique. Aucune variation de pourcentage de fixation n'a été observée avant et après la réaction de fixation avec l'OTB (**Figure 56**). Ces résultats confirment que la réponse obtenue avec l'OTA était due à la formation spécifique du complexe aptamère-OTA.



**Figure 56:** Contrôle de la spécificité de l'aptasensor compétitif direct et indirect.

## VII.5 Effets de la matrice et applicabilité de l'aptacapteur en flux dans la bière

Afin d'étudier la faisabilité de la méthode proposée pour de possibles applications, l'aptacapteur en flux a été utilisé dans la détermination de l'OTA dans la bière. Dans ce travail, on décrit la première application d'un aptacapteur électrochimique sur un échantillon de bière. Vu que les meilleures limite de détection et IC50 ont été obtenus avec l'aptacapteur compétitif indirect, ce format a été sélectionné pour étudier l'effet de matrice. Avant utilisation, la bière a été analysée par CLHP-FD où les chromatogrammes ont montré l'absence de traces d'OTA. La bière a été par la suite enrichie avec une solution mère d'OTA

à deux concentrations différentes comprises dans la gamme de linéarité de l'aptasensor (0,2 et 0,8 µg/L), après un prétraitement des échantillons comme décrit précédemment.

Le potentiel de travail appliqué pour la détection de la PAL (200 mV vs. Ag/AgCl) n'a pas influencé l'intensité du courant et les réponses de l'aptacapteur étaient similaires. La détection électrochimique a été par la suite réalisée sur des échantillons de bière. L'activité de la PAL était plus ou moins la même que celle obtenue dans le tampon, ce qui montre que les échantillons de bière ne possèdent aucun effet inhibiteur sur l'activité de la PAL. Les résultats obtenus ont montré une légère variation de la limite de détection et l'IC50. La précision (R.E% ou erreur relative) et les pourcentages de rendements (R% ou Recovery percentage) ont été obtenus en comparant les concentrations préparées (0,2 et 0,8 µg/L) avec celles obtenues (0,21 et 0,78 µg/L). Le Tableau 15 résume les pourcentages de rendement ainsi que les résultats analytiques obtenus. Aucune différence significative n'a été remarquée entre les concentrations préparées et les concentrations d'OTA obtenues. Les résultats montrent que notre méthode de détection développée dans un système en flux peut être appliquée pour la détection simple et rapide de l'OTA dans des échantillons réels, vu que la limite de détection obtenue est beaucoup plus faible que la limite maximale fixée par la commission européenne.

Tableau 15: Les pourcentages de rendements obtenus pour l'aptacapteur compétitif indirect

Concentration d'OTA préparée (µg/L)	Concentration d'OTA obtenue (µg/L)	R.S.D%	R.E%	R%
0,2	0,21	5	5	105
0,8	0,78	4	5	97.5

R.S.D%=coefficient de variation, R.E%=erreur relative, R%=pourcentage de rendement.

## **VII.6 Comparaison de l'aptacapteur développé avec les aptacapteurs décrits dans la littérature pour la détection de l'OTA**

La performance de notre aptasensor compétitif automatisé a été comparée à celle des aptacapteurs récemment développés pour la détection de l'OTA. Du point de vue sensibilité, la limite de détection obtenue est plus faible que celle des aptacapteurs électrochimiques, basés sur un marquage enzymatique et utilisant les billes magnétiques comme support

d'immobilisation, précédemment rapportés pour la détection de l'OTA en «batch» [213, 214]. La faible limite de détection a été expliquée par la distance de diffusion réduite et à la surface réactive fournie par le système de flux. La bonne sensibilité de notre méthode démontre clairement l'intérêt de combiner les avantages de deux techniques prometteuses, les essais à base d'aptamère et le système automatisé à flux. En dehors de cette comparaison, l'aptacapteur développé montre une meilleure sensibilité que d'autres aptacapteurs utilisant des méthodes de détection colorimétriques [144, 227, 228] ou fluorescentes [229]. Bien que certains aptacapteurs luminescents, fluorescents et sans marquage montrent une limite de détection inférieure à 0,05 µg/L, cependant, ils impliquent des procédures compliquées qui augmentent la complexité du système. De plus, ces aptasensors ont été développés en «batch», ce qui implique un long temps d'analyse [178, 216, 218]. Les performances de la méthode de détection développée dans ce travail peuvent être également comparées aux immunoessais et aux immunocapteurs développés pour la détermination de l'OTA. La méthode développée implique seulement 20 minutes pour l'analyse complète. Ce court temps d'analyse constitue un facteur très important pour certaines applications où les échantillons doivent être analysés rapidement.

## **VII.7 Avantages du système automatisé à flux**

L'utilisation d'un système de flux pour l'automatisation de biocapteurs offre plusieurs avantages:

- Détection en ligne grâce à l'automatisation;
- Réduction du temps d'analyse, amélioration de la manipulation des fluides et simplification des étapes d'optimisation;
- Les procédures sont entièrement automatisées grâce au logiciel développé sous LAB VIEW, ce qui évite l'erreur humaine et fait de la méthode de détermination une méthode très précise et reproductible;
- La sensibilité des méthodes de détection intégrées dans un système de flux automatisé est plus élevée ou comparables aux méthodes développées en «batch». De plus, la gamme de linéarité ainsi que la sensibilité peuvent être modifiées en changeant le volume et le débit d'injection des échantillons.
- L'effet de la matrice alimentaire ainsi que l'effet de dilution de l'échantillon sont négligés par rapport aux biocapteurs développés en «batch».

# Conclusion

Dans ce travail, l'aptamère 1.12.2 spécifique de l'OTA a été utilisé pour développer deux différents schémas d'aptasensor automatisés en flux basés sur des formats compétitifs direct et indirect et sur l'utilisation des billes magnétiques modifiées. La comparaison de la performance des deux formats a montré que l'aptacapteur compétitif indirect était plus sensible que l'aptacapteur compétitif direct. Son applicabilité a été validée par la détection de l'OTA dans la bière. Les résultats ont montré l'amélioration de la performance analytique de la méthode par rapport aux aptacapteurs, développés en «batch», précédemment décrits dans la littérature. L'incorporation des aptamères dans un système de flux a augmenté la sensibilité du système pour la détermination de l'OTA à de faibles concentrations. Cela a été atteint grâce à l'automatisation de toutes les procédures, de la fabrication de l'aptacapteur jusqu'à la détection. Ainsi, l'aptasensor automatisé développé permet de réduire le temps d'analyse et de diminuer la complexité de la méthode.

Vue sa simplicité, notre système peut donc être utilisé dans le développement d'autres biocapteurs pour la détection de plusieurs molécules cibles. De plus, il est facile à utiliser par du personnel non qualifié pour la détection en ligne de différentes cibles dans plusieurs domaines.



## *Chapitre 4*

### *Sélection d'un aptamère spécifique de l'ochratoxine B par SELEX*

# Introduction

Dans les chapitres précédents de la thèse, l'OTB a été utilisée comme analyte non spécifique, il a été démontré que l'aptamère anti-OTA ne reconnaît pas l'OTB. Vu que le même aliment peut être contaminé au même moment par l'OTA et l'OTB, il est d'une grande importance de développer des outils de détection pour les deux toxines en utilisant deux aptamères différents. On vise donc dans cette partie du travail de sélectionner un aptamère spécifique de l'OTB par le procédé SELEX. Afin que l'aptamère sélectionné soit spécifique pour l'OTB, une étape de contre sélection a été réalisée en incubant la banque d'ADN avec l'OTA. La banque d'ADN a été par la suite mise en contact avec l'OTB immobilisée sur des billes magnétiques. L'ADN lié aux billes magnétiques-OTB a été décroché par chauffage et amplifié par PCR. Les deux brins de l'ADN issu de l'amplification de l'éluat doivent être séparés par dénaturation alcaline afin d'obtenir l'ADN simple brin qui sera utilisé dans le cycle suivant du SELEX. Cependant, un problème, rencontré lors de l'étape de séparation des brins d'ADN, a empêché le passage au deuxième cycle du SELEX et donc à la poursuite du SELEX.

## I. Librairies et amorces utilisées

La banque ADN utilisée dans ce travail comporte 78 nucléotides, il s'agit d'une séquence variable contenant 40 nucléotides aléatoires, flanquée en 3' par une séquence définie de 18 nucléotides et en 5' par une séquence de 20 nucléotides. Ces régions fixes constituent des sites de liaison des amorces lors de l'amplification par PCR. Le nombre de séquences entrant dans la sélection de l'aptamère de l'OTB est donc de  $4^{40}$  soit  $1,24 \times 10^{24}$  séquences différentes.

### **Librairie (Eurogentec, Angers, France):**

5'-GGTATTGAGGGTCGCATC-40N-GATGGCTCTAACTCTCCTCT-3'

L'amorce anti-sens a été marquée avec la biotine afin de permettre la séparation des deux brins des produits PCR. L'amorce sens a été marquée par un marqueur fluorescent (la cyanine Cy3) afin de faciliter la visualisation du brin purifié.

**Brin sens (Eurogentec, Angers, France):**

5'-Cy3-GGTATTGAGGGTCGCATC-3'

**Brin Anti-sens (Eurogentec, Angers, France):**

5'- Biotine-AGAGGAGAGTTAGAGCCATC-3'

## **II. Immobilisation de la cible**

### **II.1 Choix du support d'immobilisation**

Une des étapes cruciales d'un protocole de SELEX, pour une sélection d'aptamères avec une forte affinité et spécificité, est la séparation efficace des oligonucléotides liés à la cible de ceux non liés à la cible. L'immobilisation de la molécule cible sur une matrice particulière permet justement une séparation efficace. Dans ce cas, la librairie des oligonucléotides est incubée avec la molécule cible immobilisée. La méthode conventionnelle de séparation se base sur la chromatographie d'affinité en immobilisant la molécule cible sur une colonne de sépharose ou d'agarose. Cependant, cette méthode implique des quantités énormes de cible. L'utilisation des billes magnétiques offrent plusieurs avantages tels que l'implication de faibles volumes de l'échantillon (50 à 100 µL), la simple manipulation des échantillons et la possibilité d'automatisation. La technique de séparation magnétique est plus rapide, plus facile et efficace. Des billes magnétiques 'M-270' (Invitrogen, USA) aminées ont été donc utilisées comme support d'immobilisation de l'OTB.

### **II.2 Synthèse des billes magnétiques-OTB**

Les billes magnétiques ont été lavées trois fois avec du tampon PBS puis incubées avec l'OTB et le mélange EDC/NHS pendant une nuit à température ambiante. Le mélange EDC/NHS est utilisé pour activer le groupement carboxyle de l'OTB. La réaction a été ensuite arrêtée avec 30 mM de glycine et les billes ont été lavées trois fois avec du tampon PBS afin d'éliminer les résidus non liés. Finalement, les billes modifiées ont été remises en suspension dans du PBS et conservées à 4°C.

## II.3 Vérification de la conjugaison par ELISA

Un test ELISA a été réalisé afin de vérifier l'immobilisation de l'OTB sur les billes magnétiques. Pour cela, 150  $\mu\text{L}$  de la solution de billes modifiées avec l'OTB diluées dans un tampon PBS ont été déposés sur les puits d'une microplaque, 96 puits (Greiner, Allemagne). Le tampon a été par la suite éliminé en utilisant un support magnétique Adem-Mag 96 (Ademtech, Pessac, France) adapté aux microplaques de 96 puits. Chaque puits a été ensuite bloqué par 200  $\mu\text{L}$  de BSA 1% pendant 1 heure. 100  $\mu\text{L}$  d'anticorps anti-OTA à 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ont été incubés avec les billes-OTB pendant 1 heure suivis par 100  $\mu\text{L}$  d'anticorps secondaire anti lapin marqué à la phosphatase alcaline dilué à 1/2500. Après une heure, 100  $\mu\text{L}$  du substrat de la PAL ont été ajoutés et l'absorbance a été mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque Labsystems Multiskan EX (Thermo Life Sciences, France). Des billes magnétiques aminées non modifiées ont été utilisées comme contrôle.

### *Résultats:*

Une forte absorbance a été observée pour les deux types de billes, modifiées et non modifiées. Cela peut être dû à une faible concentration de l'anticorps primaire car il ne possède que 9% de réactivité croisée vers l'OTA et/ou à un blocage insuffisant.

Le test ELISA a été donc refait en utilisant la caséine 2% (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, Fallavier, France) pour bloquer les sites non spécifiques et en testant trois concentrations différentes d'anticorps anti-OTA (1,33, 2 et 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

La concentration d'anticorps primaire permettant d'obtenir la meilleure différence d'absorbance entre les billes modifiées et non modifiées était 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . L'absorbance obtenue dans le cas des billes modifiées avec l'OTB était 4 fois plus importante que celle obtenue avec les billes non modifiées. Cela confirme donc que l'OTB est bien immobilisée sur la surface des billes magnétiques.

### **III. Contre sélection ou clearing**

Avant de mettre la librairie d'oligonucléotides en contact avec la cible, une étape préalable de contre sélection est réalisée. Il s'agit de mettre la librairie en contact avec une autre cible qu'on souhaite qu'elle ne sera pas reconnue par l'aptamère sélectionné, on utilise dans ce cas l'OTA. Des billes magnétiques modifiées avec l'OTA ont été donc mises en contact avec la librairie afin d'éliminer les séquences ayant une affinité pour l'OTA.

1 nmole de la librairie d'oligonucléotides préparée dans un tampon DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Sigma, France) a été chauffée à 94 °C et laissée 5 minutes à 4 °C puis 5 minutes à température ambiante et diluée dans 5 mL de DPBS-Tween. 150 µL de billes-OTA ont été lavées 3 fois avec du tampon DPBS puis incubées avec la banque d'oligonucléotides sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante. Le surnageant contenant l'ADN n'ayant pas été lié aux billes-OTA a été récupéré et utilisé pour la sélection contre l'OTB.

### **IV. Sélection : Hybridation avec l'OTB**

Les billes modifiées avec l'OTB ont été lavées 3 fois avec du tampon DPBS et incubées avec le surnageant obtenu lors de l'étape de contre sélection pendant 30 minutes. Le surnageant a été ensuite éliminé et les billes sont lavées avec 1 ml de tampon DPBS. Les billes magnétiques-OTB liées à l'ADN sélectionné ont été mises en suspension dans 200 µL d'eau. Les séquences sélectionnées sont à la fin éluées par chauffage des billes à 96 °C pendant 10 minutes. L'éluat récupéré sera amplifié par PCR et utilisé dans les prochains cycles du SELEX.

# V. Amplification par PCR et révélation par électrophorèse

## V.1 Réactifs

- Tampon Go Taq 5X (Proméga, France);
- $MgCl_2$  25 mM (Proméga, France);
- dNTP (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates), (Proméga, France);
- Go Taq polymérase (5 u/ $\mu$ L), (Proméga, France);
- Amorces sens et anti sens, (Eurogentec, Angers, France);
- Marqueurs de taille (Smartladder) MW 1700-10, (Eurogentec, Angers, France);
- Tampon de charge (Bleue de Bromophénol, glycérol et  $H_2O$ ), (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France);
- Tampon TBE (Tris, Borate et EDTA), (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France);
- Agarose pour électrophorèse (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France).

## V.2 PCR

Toutes les amplifications PCR ont été réalisées par un thermocycler mastercycler (Eppendorf, Le Pecq, France). L'ADN est alors amplifié en utilisant le mélange PCR suivant:

Tableau 16: Composition du mélange PCR

Composant	Volume final
Tampon Go Taq (5X)	10 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2 µL
dNTP (10 mM)	2 µL
Amorce sens (10 µM)	2 µL
Amorce A.sens (10 µM)	2 µL
Go Taq polymerase (5 u/µL)	0,25 µL
Matrice ADN	5 µL
H <sub>2</sub> O	Compléter jusqu'à 50 µL

Les amplifications ont été réalisées en utilisant le programme PCR suivant:

Tableau 17: Programme PCR

Etapes	Température	Temps (Secondes)
1	95 °C	30
2	95 °C	20
3	50° C	30
4	72° C	30
5	Retour à 2 :	Nombre de cycles (n)
6	72 °C	30
7	20 °C	Pause

L'électrophorèse de l'ADN a été réalisée dans un gel d'agarose creusé de puits où seront déposées les solutions d'ADN à analyser. Un gel d'agarose de 2% a été préparé et utilisé dans la séparation des produits PCR. 1,8 µL de Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (Interchim, France) sont ajoutés à 30 mL de gel (cette molécule s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN) et va permettre de visualiser l'ADN dans le gel placé sur la table UV. Pour chaque échantillon, 5 µL d'ADN + 5 µL d'eau + 2 µL de tampon de charge sont

déposés. Un marqueur de taille est déposé des deux côtés du gel afin de disposer d'une référence de taille. La migration se fait, dans un tampon basique TBE au sein d'une cuve d'électrophorèse (BIO-RAD), du pôle négatif au pôle positif à 90 volts pendant environ 30 minutes.

## VI. Optimisation du nombre de cycles PCR

Plusieurs amplifications PCR ont été réalisées afin d'optimiser le nombre de cycles (n) permettant d'obtenir la meilleure quantité d'ADN. En premier lieu, une première PCR a été réalisée en testant 12, 14 et 16 cycles.

L'éluat obtenu de la réaction de fixation du premier cycle a été donc amplifié par PCR, un témoin négatif a été réalisé en parallèle en amplifiant de l'eau distillée afin de confirmer l'absence de contaminations.

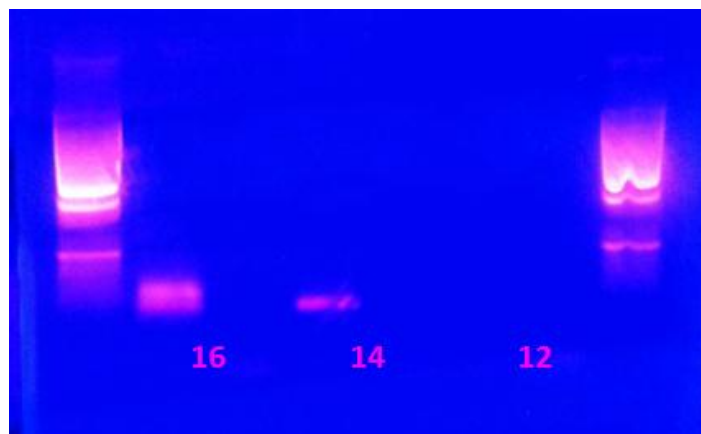


Figure 57: Optimisation de la première PCR.

On remarque l'absence de bande à 12 cycles, et l'apparition d'un surproduit à 16 cycles. L'absence de bande a été également remarquée dans le cas des témoins négatifs ce qui montre l'absence de contaminations. D'après ces résultats, on a constaté que 14 est le nombre idéal de cycles pour la première PCR.

Après optimisation de la première PCR, une deuxième PCR a été réalisée en utilisant le produit obtenu à 14 cycles. Ce dernier a été donc amplifié à 2, 4 et 6 cycles supplémentaires.



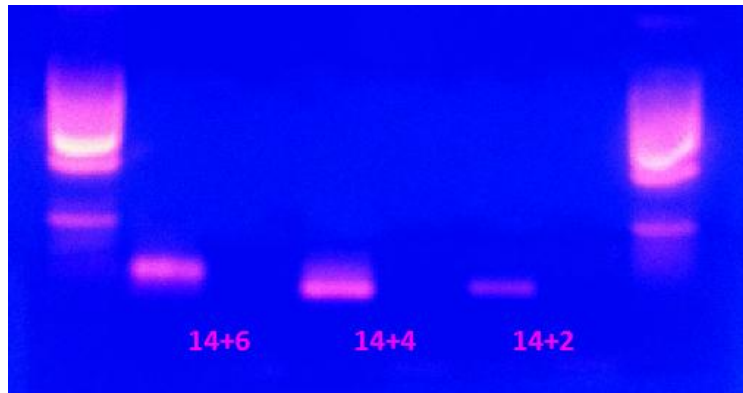


Figure 58: Optimisation de la deuxième PCR (1).

On remarque le début d'apparition des surproduits ADN à partir du quatrième cycle, on a donc réalisé une PCR avec un nombre de cycle intermédiaire: 14+3 cycles.

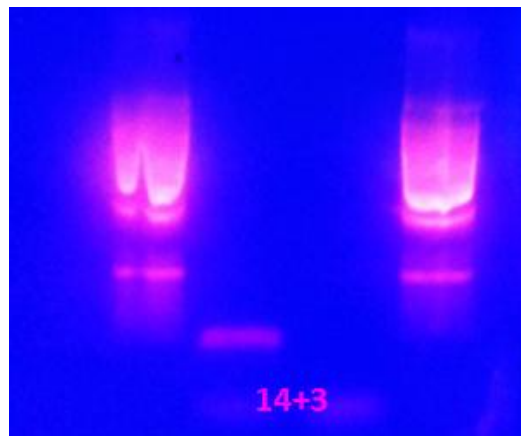


Figure 59: Optimisation de la deuxième PCR (2)

Une absence de surproduit a été observée, on a choisi donc d'amplifier l'éluat du premier cycle à 14+3 cycles qui semble être le nombre idéal.

Afin de commencer le deuxième cycle du SELEX avec une quantité suffisante d'ADN simple brin, 50 PCR ont été réalisées et 2,5 mL de produit PCR ont été obtenus. La quantité d'ADN (1) a été mesurée par spectrophotométrie UV à 260 nm (Hewlett Packard diode array 8451A) en utilisant une cuve pour les petits volumes (Cuve TrayCell, Hellma-analytics, France).

## VII. Séparation des produits PCR doubles brins en ADN simple brin

Vu que l'objectif de ce travail est de sélectionner un aptamère simple brin, les produits PCR doubles brins issus de l'amplification de l'éluat du premier cycle doivent être déshybridés en ADN simple brin afin d'être utilisés dans le deuxième cycle du SELEX. Pour cela, des billes d'agarose couplées à la streptavidine (Pierce, France) ont été utilisées pour fixer l'ADN dont l'un des deux brins est biotinylé, et on a utilisé des colonnes de centrifugation 0,8 ml (Pierce, France) pour séparer les deux brins par dénaturation alcaline.

Les billes d'agarose sont lavées trois fois avec du tampon DPBS et centrifugées deux minutes à 4000 rpm, puis mises en interaction avec le produit PCR sous agitation pendant 2 heures à température ambiante. Le mélange de l'interaction est ensuite déposé sur une colonne de centrifugation par volumes de 500  $\mu\text{L}$  et passage par gravité. La fraction non retenue a été conservée et l'absorbance a été mesurée (2). Après lavage au tampon DPBS, une élution a été réalisée avec 200  $\mu\text{L}$  de NaOH 200 mM préparée extemporanément, après 5 minutes d'interaction colonne fermée, le liquide est filtré par gravité et l'éluat est récupéré dans un eppendorf contenant 50  $\mu\text{L}$  de tampon Tris 1M pH 7,5 (pour neutraliser la solution et éviter la dégradation de l'ADN). L'élution a été réalisée trois fois afin de permettre l'élution de toute la quantité d'ADN. Les fractions d'élution sont précipitées par ajout de 27,5  $\mu\text{L}$  d'acétate de sodium 3M contenant 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  pH 5,2 puis 825  $\mu\text{L}$  d'éthanol 100%. Les éluats ont été alors placés à  $-20^\circ\text{C}$  pendant la nuit, puis centrifugés pendant 30 minutes à 34000 rpm. Après élimination du maximum d'éthanol, le culot est repris dans 50  $\mu\text{L}$  de tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,5 est l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie (3).

Tableau 18: Mesure de la quantité d'ADN dans le produit PCR (1), dans l'éluat obtenu après interaction avec les billes d'agarose-streptavidine (2) et dans l'éluat de la dénaturation (3)

	Absorbance	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Quantité d'ADN (pmole)
(1)	0,28	2500	1460
(2)	0,26	50	433,33
(3)	0,02	50	2,08

D'après le Tableau 18, on remarque la présence de très faibles quantités d'ADN dans l'éluat issu de la dénaturation. Toute la quantité a été détectée dans l'éluat obtenu après

l'interaction du produit PCR avec les billes d'agarose streptavidine. Cela montre que l'interaction biotine-streptavidine n'a pas eu lieu.

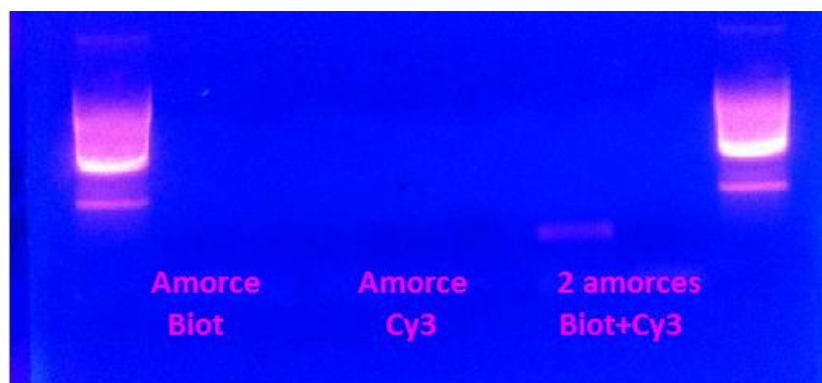
#### ***Utilisation des billes magnétiques M280-streptavidine***

L'étape de séparation a été répétée en utilisant des billes magnétiques M280-streptavidine (Invitrogen, U.S.A) à la place des billes d'agarose streptavidine, selon la procédure décrite par Paul *et al* [230]. 50 µg d'ADN double brin ont été incubés avec (2 à 10 mg) de billes magnétiques-streptavidine, préalablement lavées, sous agitation pendant 1 heure à température ambiante. Après deux lavages avec le tampon BW (Binding Washing) (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 2M NaCl), une dénaturation alcaline a été réalisée selon le même protocole décrit dans le paragraphe VII.

Le même résultat a été obtenu montrant l'absence d'interaction biotine-streptavidine.

#### ***Réalisation d'une amplification PCR à une seule amorce***

Malgré l'affinité élevée de la biotine pour la streptavidine, tous les résultats précédents montrent l'absence d'interaction entre la streptavidine et la biotine. Il y a donc une possibilité que l'amorce biotinylée n'a pas été utilisée pendant l'amplification PCR. Trois amplifications PCR ont été réalisées et comparées en utilisant; (1) les deux amorces, (2) l'amorce biotinylée seulement et (3) l'amorce marquée à la cyanine. Une électrophorèse des trois PCR a été réalisée afin de comparer les trois produits (Figure 60).



**Figure 60:** Electrophorèse de produits PCR en utilisant une amorce-biotine, une amorce-cyanine et en utilisant les deux amorces.

La PCR à une seule amorce n'a pas donné de produits PCR dans les deux cas testés. Cela confirme que l'amorce biotinylée a été utilisée lors de l'amplification et donc la présence

de la biotine dans les produits PCR. Malgré sa présence, cette biotine ne réagit pas avec la streptavidine.

### *Dénaturation et renaturation de l'ADN*

Une autre hypothèse peut être discutée; la possibilité que l'ADN ait reçu une structuration qui masque la biotine. Pour cela, une dénaturation à 96°C et une renaturation par refroidissement progressive de l'ADN ont été réalisées avant de procéder à la séparation des brins. Cependant, le même problème a été rencontré et aucune interaction biotine-streptavidine n'a été notée.

## **Conclusion**

L'objectif de ce chapitre était de sélectionner un aptamère spécifique de l'OTB. On a rencontré plusieurs problèmes. Les contaminations lors des PCR ont été résolues en utilisant des cônes à filtres (Gilson, France). Cependant, la séparation des brins d'ADN issu de l'amplification de l'éluat du premier cycle du SELEX s'est avérée impossible. Plusieurs hypothèses ont été vérifiées mais aucune d'elles n'a permis de résoudre ce problème. Malgré ce résultat négatif, 80% des principes du processus SELEX ont été acquis. Ce travail peut donc être repris dans le futur en utilisant d'autres tampons lors de la fixation ou lors de l'amplification afin de trouver les meilleures conditions qui permettent une bonne interaction entre la biotine du brin d'ADN et la streptavidine. Si le problème persiste, un autre marquage d'amorces et une autre méthode de séparation pourront être utilisés.

# *Conclusion générale*

Les biorécepteurs synthétiques tels que les aptamères représentent une très bonne alternative aux anticorps dans les bioessais analytiques. Les aptamères sont générés par des méthodes de sélection *in vitro* ce qui permet la production chimique des oligonucléotides caractérisés par une forte affinité, spécificité et sélectivité comparables à celles des anticorps. Les aptamères ont été utilisés dans différentes applications analytiques, allant des séparations jusqu'aux biocapteurs.

Dans ce travail, les aptamères ont été utilisés comme molécules de reconnaissance dans le développement de nouvelles méthodes bioanalytiques pour la détermination de l'OTA dans la bière. La performance des aptamères a été d'abord évaluée dans la mise au point d'une méthode d'oligoextraction de l'OTA. Deux aptamères spécifiques de l'OTA, l'aptamère 1.12.2 [119] sélectionné par Cruz-Agado et Penner et l'aptamère H12 développé par Barthelmebs *et al* [144], ont été testés. Ces aptamères ont été immobilisés selon trois procédures. Seul l'oligoadsorbant basé sur l'immobilisation covalente de l'aptamère 1.12.2 amino-modifié sur un gel de sépharose activée par le CNBr a montré de bonnes performances. Une très bonne capacité de rétention pour l'OTA a été observée avec des rendements d'extraction compris entre 90 et 100%. La spécificité de cet oligoadsorbant a été évaluée à l'aide d'un support de contrôle préparé à base d'un aptamère négatif qui ne reconnaît pas l'OTA. La sélectivité a été évaluée en appliquant les oligoadsorbants sur des échantillons contaminés par l'OTB, où il s'est avéré que l'OTB n'est pas reconnue par l'oligoadsorbant. Des échantillons de bière ont été utilisés pour tester l'applicabilité de la méthode et l'effet de matrice. A la fin, les oligoadsorbants ont été comparés avec des immunoadsorbants commerciaux en termes de capacités de rétention et de régénération. Les deux supports ont montré des performances comparables, ce qui valide notre méthode, mais contrairement aux immunoadsorbants qui sont des colonnes à usage unique, nos oligoadsorbants sont réutilisables sans perte significative de performance. On a pu donc, dans une première partie du travail, mettre au point une nouvelle méthode d'extraction efficace, simple et peu onéreuse en utilisant une nouvelle classe de molécules de reconnaissance chimiquement synthétisées.

Les avantages des aptamères ont été par la suite combinés à ceux de l'injection automatique en flux pour le développement d'un nouvel outil de détection; un aptacapteur électrochimique entièrement automatisé pour la détection en ligne de l'OTA. Vue sa bonne

affinité pour l'OTA, l'aptamère 1.12.2 a été utilisé dans la mise au point de cet aptacapteur. Des billes magnétiques ont été sélectionnées pour immobiliser l'aptamère et sa cible sur la surface de l'électrode. La méthode de détection est basée sur un test compétitif où les deux formats direct et indirect ont été testés. Dans le format direct, l'aptamère est immobilisé sur l'électrode, et l'OTA libre présente dans l'échantillon entre en compétition avec l'OTA marqué avec la phosphatase alcaline pour se lier à l'aptamère. Alors que dans le format indirect, c'est l'OTA qui est immobilisée sur la surface de l'électrode. Après injection de l'aptamère, l'OTA immobilisée entre en compétition avec l'OTA libre pour se lier à l'aptamère marqué. Après l'injection du substrat, on obtient un signal qui est mesuré par ampérométrie et est indirectement proportionnel à la quantité de l'OTA dans l'échantillon. Dans ce travail, toutes les procédures ont été automatisées avec un système de détection en flux. D'après les résultats obtenus, on constate l'amélioration de la performance analytique de la méthode apportée par l'utilisation de l'injection automatique en flux. Cela a permis de réduire le temps d'analyse, de simplifier les procédures de manipulations et d'augmenter la sensibilité. Lors de l'application de la méthode sur des échantillons de bière, de très bons rendements ont été obtenus avec de bonnes corrélations entre les solutions standards d'OTA et les échantillons réels. Cela montre que notre aptacapteur peut être utilisé pour une détection rapide et sensible de l'OTA dans les matrices alimentaires. Grâce à sa simplicité, cette technologie pourra être transférée pour d'autres applications dans plusieurs domaines.

En conclusion, cette thèse rapporte le développement de nouvelles méthodes bioanalytiques pour l'extraction et la détection de l'OTA dans les matrices alimentaires. Ces méthodes ont été caractérisées par de bonnes spécificité et sensibilité, tout en étant simples et peu onéreuses grâce à l'utilisation des aptamères, des électrodes SPCE et de l'injection automatique en flux.

## *Perspectives*

- Les procédures du SELEX contre l'OTB seront poursuivies après résolution du problème de séparation des deux brins des produits PCR.
- Les avantages de l'utilisation des aptamères dans le développement des outils bioanalytiques ont été mis en évidence dans ce manuscrit. Vu les effets néfastes des ochratoxines sur la santé humaine et animale, il serait intéressant de sélectionner d'autres aptamères vers d'autres ochratoxines tels que l'OTHQ qui s'est avérée plus toxique que l'OTA.
- Une fois sélectionnés, les aptamères de l'OTB et l'OTHQ pourront être utilisés pour transposer les techniques d'extraction et de détection mises au point dans ce travail de thèse pour l'analyse de ces deux ochratoxines. La sélection de ces aptamères permettra de développer un aptacapteur multiple à base des trois aptamères pour la détection simultanée des trois ochratoxines A, B et HQ.
- Dans ce travail de thèse, on a démontré l'efficacité des oligoadsorbants dans l'extraction de l'OTA, comme on a pu mettre en évidence les améliorations que peut porter l'utilisation d'un système automatisé en flux. Ça serait donc très avantageux de combiner les deux systèmes en développant un oligoadsorbant entièrement automatisé dans un système de flux.
- Récemment, Reiter *et al* ont rapporté une méthode d'extraction de l'OTA à partir des grains contaminés [162]. Ils ont donc mis au point une colonne d'immunoaffinité en immobilisant l'anticorps spécifique de l'OTA sur une matrice de sol-gel. Les auteurs ont montré que l'utilisation de cette matrice permet un simple piégeage de l'élément de reconnaissance sans liaison covalente. On envisage donc dans un futur travail, de développer un oligoadsorbant à base de sol-gel pour l'extraction des ochratoxines des aliments.
- Finalement, vue la présence de l'OTA dans différentes matrices complexes, les méthodes développées seront appliquées sur d'autres échantillons alimentaires tels que le café et les céréales.



# Liste des figures

<i>Figure 1: Structure chimique de l'OTA [15].</i>	11
<i>Figure 2: Schéma de la sélection in vitro [71].</i>	21
<i>Figure 4: (A) Séquence primaire et structure secondaire d'un aptamère sélectionné contre l'élément TAR du VIH-1. Le motif consensus identifié au terme de la sélection est indiqué en gras dans la séquence primaire et les parties complémentaires qui constituent une tige double brin sont soulignées. (B) Structure tertiaire déterminée par étude de résonance magnétique nucléaire de l'aptamère sélectionné contre l'élément TAR du VIH-1, associé à sa cible [70].</i>	29
<i>Figure 6: Motifs structuraux rencontrés dans les aptamères [132].</i>	32
<i>Figure 8: Représentation schématique de l'aptamère de la thrombine [117].</i>	33
<i>Figure 10: Protocole d'extraction sur phase solide [149].</i>	37
<i>Figure 11: Description d'un système d'extraction en ligne [150].</i>	40
<i>Figure 12: Représentation schématique d'une colonne d'immunoaffinité. Elle contient une phase d'extraction solide fabriquée d'un support modifié avec un anticorps spécifique de l'analyte).</i>	44
<i>Figure 15: les différents types de biocapteurs ampérométriques [182].</i>	54
<i>Figure 17: Les immunoessais compétitifs direct (A) et indirect (B).</i>	57
<i>Figure 18: Développement d'un immunoessai par déplacement en utilisant des billes modifiées-OTB pour la détection de l'OTA [193].</i>	58
<i>Figure 19: les différentes modifications des aptamères [132].</i>	61
<i>Figure 20: Les bioessais à base d'aptamères en formats sandwich aptamère-cible-aptamère et aptamère-cible-anticorps [210].</i>	62
<i>Figure 21: Représentation schématique de deux bioessais compétitifs pour la détermination de l'OTA (A) ELAA compétitif direct et (B) ELAA compétitif indirect [144].</i>	63
<i>Figure 22: Séquence de l'aptamère 1.12.2 anti-OTA.</i>	69
<i>Figure 23: Séquence de l'aptamère H12 anti-OTA.</i>	69

<i>Figure 24: Les structures prédites des aptamères H12 et 1.12.2 [144].</i>	70
<i>Figure 25: Immobilisation de l'aptamère biotinylé sur l'agarose activé par la streptavidine [220].</i>	70
<i>Figure 26: Immobilisation d'aptamère amino-modifié sur la silice activée par la glutaraldéhyde [220].</i>	71
<i>Figure 27: Schéma d'activation de la sépharose par le bromure de cyanogène CNBr.</i>	72
<i>Figure 29: Procédure d'oligoextraction de l'OTA.</i>	76
<i>Figure 30: Courbe d'étalonnage CLHP-FD des standards OTA préparés dans le tampon de sélection.</i>	77
<i>Figure 31: Comparaison d'un chromatogramme obtenu après injection d'un échantillon de bière enrichi en OTA (A) et d'un chromatogramme obtenu après injection directe d'un échantillon de bière en CLHP-FD.</i>	78
<i>Figure 32: Courbe d'étalonnage CLHP-FD échantillons de bière dopés d'OTA.</i>	79
<i>Figure 33: Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant H12 et l'oligoadsorbant de contrôle préparés à base de sépharose activée par le CNBr.</i>	81
<i>Figure 34: Profil d'extraction obtenu sur l'oligoadsorbant à base d'aptamère H12 et de la sépharose activée-CNBr, avec une pré-incubation de l'aptamère avec l'OTA.</i>	82
<i>Figure 36: Comparaison des profils d'élution de l'OTA par l'oligoadsorbant et les supports de contrôle.</i>	83
<i>Figure 37: Performance de l'oligoadsorbant avec les solutions standards d'OTA.</i>	84
<i>Figure 38: Performances de l'oligoadsorbant avec les échantillons de bière enrichis.</i>	85
<i>Figure 39: Chromatogrammes de CLHP-FD montrant le pic d'élution de l'OTA (A) d'une solution standard (2ng/mL) et (B) d'un échantillon de bière enrichi à 2 ng/mL d'OTA.</i>	86
<i>Figure 40: Contrôle de la performance de l'oligoadsorbant après trois utilisations sur les solutions standards et la bière.</i>	86
<i>Figure 41: Comparaison des profils d'élution de l'OTB et l'OTA par l'oligoadsorbant.</i>	87
<i>Figure 42: Etapes de fabrication des électrodes de carbones sérigraphiées.</i>	93
<i>Figure 43: Schéma du système d'injection et la cellule de flux utilisés dans l'automatisation de l'aptacapteur de l'OTA.</i>	96

<i>Figure 44: Principe de la détection électrochimique de l'OTA.....</i>	<i>99</i>
<i>Figure 45: Effet du débit sur la performance de l'aptacapteur à un potentiel appliqué de 200 mV vs Ag/AgCl. ....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 46: Présentation schématique du principe de l'aptacapteur compétitif direct en flux. ....</i>	<i>102</i>
<i>Figure 47: Effet du volume des billes magnétiques-aptamère sur la performance de l'aptacapteur compétitif direct.....</i>	<i>103</i>
<i>Figure 49: Effet du temps d'incubation de l'OTA-biotine et de l'avidine-PAL sur la performance de l'aptacapteur compétitif direct avec un potentiel appliqué de 200 mV vs Ag/AgCl. ....</i>	<i>105</i>
<i>Figure 50: Variation de l'amplitude du signal en fonction du temps d'incubation du substrat de la PAL.....</i>	<i>106</i>
<i>Figure 51: Courbe de calibration obtenue pour l'aptacapteur compétitif direct en flux. ....</i>	<i>107</i>
<i>Figure 52: Présentation schématique du principe de l'aptacapteur compétitif indirect en flux. ....</i>	<i>109</i>
<i>Figure 53: Effet du volume des billes magnétiques-OTA sur la performance de l'aptacapteur compétitif indirect. ....</i>	<i>110</i>
<i>Figure 54: Effet de la concentration de l'aptamère sur la performance de l'aptacapteur compétitif indirect. ....</i>	<i>110</i>
<i>Figure 55: Courbe de calibration obtenue pour l'aptacapteur compétitif indirect en flux. ..</i>	<i>112</i>
<i>Figure 56: Contrôle de la spécificité de l'aptasensor compétitif direct et indirect. ....</i>	<i>114</i>
<i>Figure 57: Optimisation de la première PCR.....</i>	<i>125</i>
<i>Figure 58: Optimisation de la deuxième PCR (1).....</i>	<i>126</i>
<i>Figure 59: Optimisation de la deuxième PCR (2).....</i>	<i>126</i>
<i>Figure 60: Electrophorèse de produits PCR en utilisant une amorce-biotine, une amorce-cyanine et en utilisant les deux amorces. ....</i>	<i>128</i>

# Liste des tableaux

<i>Tableau 1: caractéristiques spectrales de l'OTA [28].....</i>	<i>12</i>
<i>Tableau 3: Structures chimiques de l'OTA et ses métabolites [60].....</i>	<i>18</i>
<i>Tableau 4: les IACs commerciales pour l'extraction de l'OTA [44].....</i>	<i>46</i>
<i>Tableau 5: les différentes méthodes d'immobilisation des biomolécules. ....</i>	<i>52</i>
<i>Tableau 6: Les conditions de CLHP pour la détermination de l'OTA. ....</i>	<i>77</i>
<i>Tableau 7: Résultats des mesures spectrophotométriques de la solution d'aptamère avant et après l'immobilisation sur le support de sépharose. ....</i>	<i>80</i>
<i>Tableau 9: Paramètres optimisés pour l'aptacapteur automatisé en flux. ....</i>	<i>101</i>
<i>Tableau 10: Pourcentages de fixation obtenus pour chaque concentration d'OTA testée dans le format direct. ....</i>	<i>107</i>
<i>Tableau 11: Tableau récapitulatif des différents paramètres de l'équation sigmoïdale pour le format direct.....</i>	<i>108</i>
<i>Tableau 12: Pourcentages de fixation obtenus pour chaque concentration d'OTA testée dans le format indirect.....</i>	<i>112</i>
<i>Tableau 13: Tableau récapitulatif des différents paramètres de l'équation sigmoïdale pour le format indirect.....</i>	<i>112</i>
<i>Tableau 14: Comparaison entre la sensibilité de l'aptacapteur direct et celle de l'aptacapteur indirect. ....</i>	<i>113</i>
<i>Tableau 15: Les pourcentages de rendements obtenus pour l'aptacapteur compétitif indirect. ....</i>	<i>115</i>
<i>Tableau 16: Composition du mélange PCR.....</i>	<i>124</i>
<i>Tableau 17: Programme PCR.....</i>	<i>124</i>
<i>Tableau 18: Mesure de la quantité d'ADN dans le produit PCR (1), dans l'éluat obtenu après interaction avec les billes d'agarose-streptavidine (2) et dans l'éluat de la dénaturation (3). ....</i>	<i>127</i>

## Références bibliographiques

1. W.B. Turner and D.C. Albridge, *Fungal metabolites*. Acad. Press, N.Y. and London, 1983. **2**.
2. E.K. Shwab and N.P. Keller, *Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes*. *Mycological Research*, 2008. **112**(Pt 2): p. 225-30.
3. M. Kostecki, H. Wisniewska, G. Perrone, A. Ritieni, P.G. Jerzy, J. Chelkowski, and A. Logrieco, *The effects of cereal substrate and temperature on production of beauvericin, moniliformin and fusaproliferin by Fusarium subglutinans ITEM-1434*. *Food Additives and Contaminants*, 1999. **16**(9): p. 361-365.
4. A. Velluti, S. Marín, L. Bettucci, A.J. Ramos, and V. Sanchis, *The effect of fungal competition on colonization of maize grain by Fusarium moniliforme, F. proliferatum and F. graminearum and on fumonisin B1 and zearalenone formation*. *International Journal of Food Microbiology*, 2000. **59**(1-2): p. 59-66.
5. M. Kokkonen, L. Ojala, P. Parikka, and M. Jestoi, *Mycotoxin production of selected Fusarium species at different culture conditions*. *International Journal of Food Microbiology*, 2010. **143**(1-2): p. 17-25.
6. N.W. Turner, S. Subrahmanyam, and S.A. Piletsky, *Analytical methods for determination of mycotoxins: a review*. *Analytica Chimica Acta*, 2009. **632**(2): p. 168-80.
7. F. Fung and R.F. Clark, *Health Effects of Mycotoxins: A Toxicological Overview*. *Clinical Toxicology*, 2004. **42**(2): p. 217-234.
8. G.S. Shephard, *Impact of mycotoxins on human health in developing countries*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2008. **25**(2): p. 146-151.
9. A. Pfohl-Leskowicz and R.A. Manderville, *Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2007. **51**(1): p. 61-99.
10. K.S. Van der Merwe, P.S. Steyn, L. Fourie, B. DeScott, and J.J. Theron, *Ochratoxin A, a toxic Metabolite Produced by Aspergillus Ochraceus*. *Nature*, 1965. **205**: p. 1112-1113.
11. J. Varga, E. Kevei, E. Rinyu, J. Téren, and Z. Kozakiewicz, *Ochratoxin production by Aspergillus species*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996. **62**(12): p. 4461-4.
12. J. Gil-Serna, C. Vázquez, N. Sardiñas, M.T. González-Jaén, and B. Patiño, *Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of Aspergillus section*

- Circumdati. Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. Food Control, 2011. **22**(2): p. 343-345.
13. C. Bogs, P. Battilani, and R. Geisen, *Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing Penicillium species and its application to analyse the occurrence of Penicillium nordicum in cured meats*. International Journal of Food Microbiology, 2006. **107**(1): p. 39-47.
  14. C. Frenette, R.J. Paugh, M. Tozlovanu, M. Juzio, A. Pfohl-Leszkowicz, and R.A. Manderville, *Structure-activity relationships for the fluorescence of ochratoxin A: insight for detection of ochratoxin A metabolites*. Analytica chimica acta, 2008. **617**(1-2): p. 153-61.
  15. Y. Grosse, I. Baudrimont, M. Castegnaro, A.-M. Betbeder, E.E. Creppy, G. Dirheimer, and A. Pfohl-Leszkowicz, *Formation of ochratoxin a metabolites and DNA-adducts in monkey kidney cells*. Chemico-Biological Interactions, 1995. **95**(1-2): p. 175-187.
  16. Petzinger and Ziegler, *Ochratoxin A from a toxicological perspective*. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2000. **23**(2): p. 91-98.
  17. A.B. Trivedi, E. Doi, and N. Kitabatake, *Detoxification of Ochratoxin A on Heating under Acidic and Alkaline Conditions*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1992. **56**(5): p. 741-745.
  18. K. JØrgensen, G. Rasmussen, and I. Thorup, *Ochratoxin A in Danish cereals 1986–1992 and daily intake by the Danish population*. Food Additives and Contaminants, 1996. **13**(1): p. 95-104.
  19. C. Araguás, E. González-Peñas, and A. López de Cerain, *Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain*. Food Chemistry, 2005. **92**(3): p. 459-464.
  20. S.C. Duarte, A. Pena, and C.M. Lino, *A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products*. Food Microbiology, 2010. **27**(2): p. 187-98.
  21. M. Vega, K. Muñoz, C. Sepúlveda, M. Aranda, V. Campos, R. Villegas, and O. Villarroel, *Solid-phase extraction and HPLC determination of Ochratoxin A in cereals products on Chilean market*. Food Control, 2009. **20**(7): p. 631-634.
  22. F.J. Cabanes, F. Accensi, M.R. Bragulat, M.L. Abarca, G. Castella, S. Minguez, and A. Pons, *What is the source of ochratoxin A in wine*. International Journal of Food Microbiology, 2002. **79**(3): p. 213-215.
  23. R. Mateo, A. Medina, E.M. Mateo, F. Mateo, and M. Jimenez, *An overview of ochratoxin A in beer and wine*. International Journal of Food Microbiology, 2007. **119**(1-2): p. 79-83.
  24. D. Spadaro, A. Lorè, A. Garibaldi, and M.L. Gullino, *Occurrence of ochratoxin A before bottling in DOC and DOCG wines produced in Piedmont (Northern Italy)*. Food Control, 2010. **21**(9): p. 1294-1297.

25. R. Remiro, E. González-Peñas, E. Lizarraga, and A. López de Cerain, *Quantification of ochratoxin A and five analogs in Navarra red wines*. Food Control, 2012. **27**(1): p. 139-145.
26. P. Battilani, N. Magan, and A. Logrieco, *European research on ochratoxin A in grapes and wine*. International Journal of Food Microbiology, 2006. **111**, Supplement **1**(0): p. S2-S4.
27. S.N. Chulze, C.E. Magnoli, and A.M. Dalcero, *Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America*. International Journal of Food Microbiology, 2006. **111**, Supplement **1**(0): p. S5-S9.
28. A. el Khoury and A. Atoui, *Ochratoxin a: general overview and actual molecular status*. Toxins (Basel), 2010. **2**(4): p. 461-93.
29. P.G. Mantle and A.M. Chow, *Ochratoxin formation in Aspergillus ochraceus with particular reference to spoilage of coffee*. International Journal of Food Microbiology, 2000. **56**(1): p. 105-109.
30. I. Studer-Rohr, D.R. Dietrich, J. Schlatter, and C. Schlatter, *The occurrence of ochratoxin A in coffee*. Food and Chemical Toxicology, 1995. **33**(5): p. 341-355.
31. M.V. Copetti, B.T. Iamanaka, M.A. Nester, P. Efraim, and M.H. Taniwaki, *Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture*. Food Chemistry, 2013. **136**(1): p. 100-104.
32. C. Bircan, *Incidence of ochratoxin A in dried fruits and co-occurrence with aflatoxins in dried figs*. Food and Chemical Toxicology, 2009. **47**(8): p. 1996-2001.
33. F. Ozbey and B. Kabak, *Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices*. Food Control, 2012. **28**(2): p. 354-361.
34. S. Patel, C.M. Hazel, A.G.M. Winterton, and E. Mortby, *Survey of ethnic foods for mycotoxins*. Food Additives and Contaminants, 1996. **13**(7): p. 833-841.
35. S.C. Duarte, C.M. Lino, and A. Pena, *Ochratoxin A in feed of food-producing animals: An undesirable mycotoxin with health and performance effects*. Veterinary Microbiology, 2011. **154**(1-2): p. 1-13.
36. C. Tuerk and L. Gold, *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*. Science (New York, N.Y.), 1990. **249**(4968): p. 505-510.
37. F. Elling, *OCHRATOXIN A-INDUCED MYCOTOXIC PORCINE NEPHROPATHY: ALTERATIONS IN ENZYME ACTIVITY IN TUBULAR CELLS*. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section A Pathology, 1979. **87A**(1-6): p. 237-243.
38. G.A. Boorman, M.R. McDonald, S. Imoto, and R. Persing, *Renal Lesions Induced by Ochratoxin A Exposure in the F344 Rat*. Toxicologic Pathology, 1992. **20**(2): p. 236-245.

39. M.D. Aleo, R.D. Wyatt, and R.G. Schnellmann, *Mitochondrial dysfunction is an early event in ochratoxin A but not oosporein toxicity to rat renal proximal tubules*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1991. **107**(1): p. 73-80.
40. T. Petkova-Bocharova and M. Castegnaro, *Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria*. IARC scientific publications, 1991(115): p. 135-137.
41. G.A. Boorman, H.L. Hong, M.P. Dieter, H.T. Hayes, A.E. Pohland, M. Stack, and M.I. Luster, *Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1984. **72**(2): p. 304-312.
42. M.I. Luster, D.R. Germolec, G.R. Burleson, C.W. Jameson, M.F. Ackermann, K.R. Lamm, and H.T. Hayes, *Selective Immunosuppression in Mice of Natural Killer Cell Activity by Ochratoxin A*. *Cancer Research*, 1987. **47**(9): p. 2259-2263.
43. S.H. Gilani, J. Bancroft, and M. Reily, *Teratogenicity of ochratoxin A in chick embryos*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1978. **46**(2): p. 543-546.
44. A. Hayat, N. Paniel, A. Rhouati, J.-L. Marty, and L. Barthelmebs, *Recent advances in ochratoxin A-producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices*. *Food Control*, 2012. **26**(2): p. 401-415.
45. European Commission, *Regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A*. *Official Journal of European Communications*, 2005. **25**: p. 3–5.
46. C. Dall'Asta, G. Galaverna, A. Dossena, and R. Marchelli, *Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine*. *Journal of Chromatography A*, 2004. **1024**(1–2): p. 275-279.
47. L. Monaci and F. Palmisano, *Determination of ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical challenges*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004. **378**(1): p. 96-103.
48. S.N.a.L.F. A. E. Pohland, *Ochratoxin A: a review*. *Pure and Applied chemistry*, 1992. **64**(7): p. 1029-1046.
49. European Commission, *Commission Regulation (EC) No 472/2002 of 12 March 2002*. *Official Journal of European Communications*, 2002. **75**: p. 18–20.
50. European Commission, *Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001*. *Official Journal of European Communications*, 2001. **77**: p. 1–13.
51. H. Valenta, *Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids*. *Journal of Chromatography A*, 1998. **815**(1): p. 75-92.
52. A. Visconti, M. Pascale, and G. Centonze, *Determination of Ochratoxin A in Wine and Beer by Immunoaffinity Column Cleanup and Liquid Chromatographic Analysis with*



- Fluorometric Detection: Collaborative Study*. Journal of AOAC International, 2001. **84**(6): p. 1818-1827.
53. I.Y. Goryacheva, S. De Saeger, M. Lobeau, S.A. Eremin, I. Barna-Vetró, and C. Van Peteghem, *Approach for ochratoxin A fast screening in spices using clean-up tandem immunoassay columns with confirmation by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS)*. Analytica Chimica Acta, 2006. **577**(1): p. 38-45.
  54. M. Becker, P. Degelmann, M. Herderich, P. Schreier, and H.-U. Humpf, *Column liquid chromatography–electrospray ionisation–tandem mass spectrometry for the analysis of ochratoxin*. Journal of Chromatography A, 1998. **818**(2): p. 260-264.
  55. E. Beltrán, M. Ibáñez, J.V. Sancho, M.Á. Cortés, V. Yusà, and F. Hernández, *UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk*. Food Chemistry, 2011. **126**(2): p. 737-744.
  56. A. Breitholtz, M. Olsen, Å. Dahlbäck, and K. Hult, *Plasma ochratoxin A levels in three Swedish populations surveyed using an ion-pair HPLC technique*. Food Additives and Contaminants, 1991. **8**(2): p. 183-192.
  57. Y. Jiao, W. Blaas, C. Rühl, and R. Weber, *Identification of ochratoxin A in food samples by chemical derivatization and gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1992. **595**(1–2): p. 364-367.
  58. S. Corneli and C.M. Maragos, *Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence: Method for the Mycotoxin Ochratoxin A*. Journal of Agricultural and Food Chem, 1998. **46**(8): p. 3162-3165.
  59. A.C. Galvis-Sánchez, A.S. Barros, and I. Delgadillo, *Method for analysis dried vine fruits contaminated with ochratoxin A*. Analytica Chimica Acta, 2008. **617**(1–2): p. 59-63.
  60. Q. Wu, V. Dohnal, L. Huang, K. Kuča, X. Wang, G. Chen, and Z. Yuan, *Metabolic pathways of ochratoxin A*. Current drug metabolism, 2011. **12**(1): p. 1-10.
  61. J.P. Harris and P.G. Mantle, *Biosynthesis of ochratoxins by Aspergillus ochraceus*. Phytochemistry, 2001. **58**(5): p. 709-716.
  62. A. Abbas, H. Valez, and A.D. Dobson, *Analysis of the effect of nutritional factors on OTA and OTB biosynthesis and polyketide synthase gene expression in Aspergillus ochraceus*. International Journal of Food Microbiology, 2009. **135**(1): p. 22-7.
  63. A. Mally, H. Keim-Heusler, A. Amberg, M. Kurz, H. Zepnik, P. Mantle, W. Volkel, G.C. Hard, and W. Dekant, *Biotransformation and nephrotoxicity of ochratoxin B in rats*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005. **206**(1): p. 43-53.

64. A. Mally, H. Zepnik, P. Wanek, E. Eder, K. Dingley, H. Ihmels, W. Völkel, and W. Dekant, *Ochratoxin A: Lack of Formation of Covalent DNA Adducts*. Chemical Research in Toxicology, 2004. **17**(2): p. 234-242.
65. A.D. Ellington, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. **346**: p. 818-822.
66. F. Chauveau, C. Pestourie, and B. Tavitian, *Les aptamères ou l'évolution moléculaire dirigée : sélection et applications*. Pathologie Biologie, 2006. **54**(4): p. 251-258.
67. R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz, *SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands*. Biomolecular engineering, 2007. **24**(4): p. 381-403.
68. R.G. Jean Jaques Toulmé, *Les aptamères: des ligands et des catalyseurs oligonucléotidiques obtenus par sélection in vitro*. médecine/sciences, 1998. **2**(14): p. 155-166.
69. S.C. Gopinath, *Methods developed for SELEX*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **387**(1): p. 171-82.
70. J.-J. Toulmé, S. Da Rocha, E. Dausse, L. Azéma, I. Lebars, and S. Moreau, *Les aptamères : du concept à l'outil*. Médecine Nucléaire, 2007. **31**(9): p. 478-484.
71. M. Mascini, *Aptamers in bioanalysis*. Wiley, 2009.
72. R.D. Jenison, S.C. Gill, A. Pardi, and B. Polisky, *High-Resolution Molecular Discrimination by RNA*. Science, 1994. **263**(5152): p. 1425-1429.
73. A.D. Ellington and J.W. Szostak, *Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures*. Nature, 1992. **355**(6363): p. 850-852.
74. D. Mann, C. Reinemann, R. Stoltenburg, and B. Strehlitz, *In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005. **338**(4): p. 1928-1934.
75. D. Grate and C. Wilson, *Inducible regulation of the S. cerevisiae cell cycle mediated by an RNA aptamer–ligand complex*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2001. **9**(10): p. 2565-2570.
76. J. Ciesiolka, J. Gorski, and M. Yarus, *Selection of an RNA domain that binds Zn<sup>2+</sup>*.
77. A. Geiger, P. Burgstaller, H. von der Eltz, A. Roeder, and M. Famulok, *RNA Aptamers That Bind l-Arginine with Sub-Micromolar Dissociation Constants and High Enantioselectivity*. Nucleic Acids Research, 1996. **24**(6): p. 1029-1036.
78. D.A. Daniels, A.K. Sohal, S. Rees, and R. Grisshammer, *Generation of RNA Aptamers to the G-Protein-Coupled Receptor for Neurotensin, NTS-1*. Analytical Biochemistry, 2002. **305**(2): p. 214-226.

79. S.D. Mendonsa and M.T. Bowser, *In Vitro Selection of High-Affinity DNA Ligands for Human IgE Using Capillary Electrophoresis*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(18): p. 5387-5392.
80. Y. Lin, Q. Qiu, S.C. Gill, and S.D. Jayasena, *Modified RNA sequence pools for in vitro selection*. Nucleic Acids Research, 1994. **22**(24): p. 5229-5234.
81. M. Mehedi Masud, M. Kuwahara, H. Ozaki, and H. Sawai, *Sialyllactose-binding modified DNA aptamer bearing additional functionality by SELEX*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004. **12**(5): p. 1111-1120.
82. M. Kwon, S.M. Chun, S. Jeong, and J. Yu, *In vitro selection of RNA against kanamycin B*. Molecules and cells, 2001. **11**(3): p. 303-311.
83. R.K. Mosing, S.D. Mendonsa, and M.T. Bowser, *Capillary Electrophoresis-SELEX Selection of Aptamers with Affinity for HIV-1 Reverse Transcriptase*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(19): p. 6107-6112.
84. D.S. Wilson and J.W. Szostak, *In vitro selection of functional nucleic acids*. Annual review of biochemistry, 1999. **68**: p. 611-647.
85. M. Rimmelé, *Nucleic Acid Aptamers as Tools and Drugs: Recent Developments*. Chemistry and Biochemistry, 2003. **4**(10): p. 963-971.
86. S. Tombelli, M. Minunni, and M. Mascini, *Analytical applications of aptamers*. Biosensors and Bioelectronics, 2005. **20**(12): p. 2424-34.
87. K.W. Uphoff, S.D. Bell, and A.D. Ellington, *In vitro selection of aptamers: the dearth of pure reason*. Current Opinion in Structural Biology, 1996. **6**(3): p. 281-288.
88. L.C. Bock, L.C. Griffin, J.A. Latham, E.H. Vermaas, and J.J. Toole, *Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin*. Nature, 1992. **355**(6360): p. 564-566.
89. K.A. Marshall and A.D. Ellington, *In vitro selection of RNA aptamers*. Methods in Enzymology, 2000. **Volume 318**: p. 193-214.
90. J. Liu and G.D. Stormo, *Combining SELEX with quantitative assays to rapidly obtain accurate models of protein-DNA interactions*. Nucleic Acids Research, 2005. **33**(17): p. e141.
91. S. Tombelli, M. Minunni, E. Luzi, and M. Mascini, *Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein*. Bioelectrochemistry, 2005. **67**(2): p. 135-141.
92. R. Stoltenburg, C. Reinemann, and B. Strehlitz, *FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005. **383**(1): p. 83-91.

93. K. Kikuchi, T. Umehara, K. Fukuda, J. Hwang, A. Kuno, T. Hasegawa, and S. Nishikawa, *RNA aptamers targeted to domain II of hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop region*. *Journal of biochemistry*, 2003. **133**(3): p. 263-270.
94. S.E. Lupold, B.J. Hicke, Y. Lin, and D.S. Coffey, *Identification and Characterization of Nuclease-stabilized RNA Molecules That Bind Human Prostate Cancer Cells via the Prostate-specific Membrane Antigen*. *Cancer Research*, 2002. **62**(14): p. 4029-4033.
95. M.B. Murphy, S.T. Fuller, P.M. Richardson, and S.A. Doyle, *An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification*. *Nucleic Acids Research*, 2003. **31**(18): p. e110.
96. M. Bianchini, M.n. Radrizzani, M.G. Brocardo, G.B. Reyes, C. Gonzalez Solveyra, and T.A. Santa-Coloma, *Specific oligobodies against ERK-2 that recognize both the native and the denatured state of the protein*. *Journal of Immunological Methods*, 2001. **252**(1-2): p. 191-197.
97. D. Schneider, L. Gold, and T. Platt, *Selective enrichment of RNA species for tight binding to Escherichia coli rho factor*. *The FASEB Journal*, 1993. **7**(1): p. 201-7.
98. J. Tang, J. Xie, N. Shao, and Y. Yan, *The DNA aptamers that specifically recognize ricin toxin are selected by two in vitro selection methods*. *ELECTROPHORESIS*, 2006. **27**(7): p. 1303-1311.
99. K.A. Davis, B. Abrams, Y. Lin, and S.D. Jayasena, *Use of a High Affinity DNA Ligand in Flow Cytometry*. *Nucleic Acids Research*, 1996. **24**(4): p. 702-706.
100. X. Yang, X. Li, T.W. Prow, L.M. Reece, S.E. Bassett, B.A. Luxon, N.K. Herzog, J. Aronson, R.E. Shope, J.F. Leary, and D.G. Gorenstein, *Immunofluorescence assay and flow-cytometry selection of bead-bound aptamers*. *Nucleic Acids Research*, 2003. **31**(10): p. e54.
101. R.Y.L. Tsai and R.R. Reed, *Identification of DNA Recognition Sequences and Protein Interaction Domains of the Multiple-Zn-Finger Protein Roaz*. *Molecular and Cellular Biology*, 1998. **18**(11): p. 6447-6456.
102. T.S. Misono and P.K.R. Kumar, *Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance*. *Analytical Biochemistry*, 2005. **342**(2): p. 312-317.
103. M. Homann and H.U. Göringer, *Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes*. *Nucleic Acids Research*, 1999. **27**(9): p. 2006-2014.
104. M.G. Theis, A. Knorre, B. Kellersch, J. Moelleken, F. Wieland, W. Kolanus, and M. Famulok, *Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(31): p. 11221-11226.

105. S. Weiss, D. Proske, M. Neumann, M.H. Groschup, H.A. Kretzschmar, M. Famulok, and E.L. Winnacker, *RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP*. Journal of Virology, 1997. **71**(11): p. 8790-7.
106. M. Famulok, *Molecular Recognition of Amino Acids by RNA-Aptamers: An L-Citrulline Binding RNA Motif and Its Evolution into an L-Arginine Binder*. Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(5): p. 1698-1706.
107. P. Bridonneau, Y.F. Chang, A.V. Buvoli, D. O'Connell, and D. Parma, *Site-directed selection of oligonucleotide antagonists by competitive elution*. Antisense & nucleic acid drug development, 1999. **9**(1): p. 1-11.
108. S. Cho, S.-H. Lee, W.-J. Chung, Y.-K. Kim, Y.-S. Lee, and B.-G. Kim, *Microbead-based affinity chromatography chip using RNA aptamer modified with photocleavable linker*. ELECTROPHORESIS, 2004. **25**(21-22): p. 3730-3739.
109. T. Fitzwater and B. Polisky, *A SELEX primer*. Methods in Enzymology, 1996. **Volume 267**: p. 275-301.
110. M. Naimuddin, K. Kitamura, Y. Kinoshita, Y. Honda-Takahashi, M. Murakami, M. Ito, K. Yamamoto, K. Hanada, Y. Husimi, and K. Nishigaki, *Selection-by-function: efficient enrichment of cathepsin E inhibitors from a DNA library*. Journal of Molecular Recognition, 2006.
111. A. Wochner, B. Cech, M. Menger, V. Erdmann, and J. Glökler, *Semi-automated selection of DNA aptamers using magnetic particle handling*. BioTechniques, 2007. **43**(3): p. 344-353.
112. R. Conrad, S. Baskerville, and A. Ellington, *In vitro selection methodologies to probe RNA function and structure*. Molecular Diversity, 1995. **1**(1): p. 69-78.
113. W.T. Horn, M.A. Convery, N.J. Stonehouse, C.J. Adams, L. Liljas, S.E. Phillips, and P.G. Stockley, *The crystal structure of a high affinity RNA stem-loop complexed with the bacteriophage MS2 capsid: further challenges in the modeling of ligand-RNA interactions*. RNA, 2004. **10**(11): p. 1776-82.
114. L. Jiang, A.K. Suri, R. Fiala, and D.J. Patel, *Saccharide-RNA recognition in an aminoglycoside antibiotic-RNA aptamer complex*. Chemistry & biology, 1997. **4**(1): p. 35-50.
115. C. Forster, A.B. Brauer, S. Brode, K.S. Schmidt, M. Perbandt, A. Meyer, W. Rypniewski, C. Betzel, J. Kurreck, J.P. Furste, and V.A. Erdmann, *Comparative crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of locked nucleic acid and RNA stems of a tenascin C-binding aptamer*. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2006. **62**(Pt 7): p. 665-8.
116. D. Kiga, Y. Futamura, K. Sakamoto, and S. Yokoyama, *An RNA aptamer to the xanthine/guanine base with a distinctive mode of purine recognition*. Nucleic Acids Research, 1998. **26**(7): p. 1755-1760.

117. W. James, *Aptamers*. Encyclopedia of Analytical Chemistry, 2006.
118. J. Ruckman, L.S. Green, J. Beeson, S. Waugh, W.L. Gillette, D.D. Henninger, L. Claesson-Welsh, and N. Janjic, *2'-Fluoropyrimidine RNA-based Aptamers to the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165): INHIBITION OF RECEPTOR BINDING AND VEGF-INDUCED VASCULAR PERMEABILITY THROUGH INTERACTIONS REQUIRING THE EXON 7-ENCODED DOMAIN*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(32): p. 20556-20567.
119. J.A. Cruz-Aguado and G. Penner, *Determination of ochratoxin a with a DNA aptamer*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(22): p. 10456-61.
120. S.T. WALLACE, R. SCHROEDER, and Eacute, *In vitro selection and characterization of streptomycin-binding RNAs: Recognition discrimination between antibiotics*. RNA, 1998. **4**(01): p. 112-123.
121. S.W. Gal, S. Amontov, P.T. Urvil, D. Vishnuvardhan, F. Nishikawa, P.K. Kumar, and S. Nishikawa, *Selection of a RNA aptamer that binds to human activated protein C and inhibits its protease function*. European journal of biochemistry / FEBS, 1998. **252**(3): p. 553-62.
122. B.E. Eaton, L. Gold, and D.A. Zichi, *Let's get specific: the relationship between specificity and affinity*. Chemistry & amp: Biology, 1995. **2**(10): p. 633-638.
123. D. Nieuwlandt, M. Wecker, and L. Gold, *In Vitro Selection of RNA Ligands to Substance P*. Biochemistry, 1995. **34**(16): p. 5651-5659.
124. L.R. Paborsky, S.N. McCurdy, L.C. Griffin, J.J. Toole, and L.L. Leung, *The single-stranded DNA aptamer-binding site of human thrombin*. Journal of biological chemistry, 1993. **268**(28): p. 20808-11.
125. H. Chen, D.G. McBroom, Y.-Q. Zhu, L. Gold, and T.W. North, *Inhibitory RNA Ligand to Reverse Transcriptase from Feline Immunodeficiency Virus†*. Biochemistry, 1996. **35**(21): p. 6923-6930.
126. R. Conrad, L.M. Keranen, A.D. Ellington, and A.C. Newton, *Isozyme-specific inhibition of protein kinase C by RNA aptamers*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(51): p. 32051-4.
127. D.H. Burke and D.C. Hoffman, *A novel acidophilic RNA motif that recognizes coenzyme A*. Biochemistry, 1998. **37**(13): p. 4653-63.
128. Q. Yang, I.J. Goldstein, H.-Y. Mei, and D.R. Engelke, *DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(10): p. 5462-5467.
129. R.D. Jenison, S.C. Gill, A. Pardi, and B. Polisky, *High-resolution molecular discrimination by RNA*. Science (New York, N.Y.), 1994. **263**(5152): p. 1425-1429.

130. T. Hermann and D.J. Patel, *Stitching together RNA tertiary architectures*. Journal of Molecular Biology, 1999. **294**(4): p. 829-849.
131. A.V. Kulbachinskiy, *Methods for selection of aptamers to protein targets*. Biochemistry (Moscow), 2007. **72**(13): p. 1505-1518.
132. N. de-los-Santos-Álvarez, M.a.J. Lobo-Castañón, A.J. Miranda-Ordieres, and P. Tuñón-Blanco, *Aptamers as recognition elements for label-free analytical devices*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2008. **27**(5): p. 437-446.
133. T. Hermann and D.J. Patel, *Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers*. Science, 2000. **287**(5454): p. 820-825.
134. K. Padmanabhan, K.P. Padmanabhan, J.D. Ferrara, J.E. Sadler, and A. Tulinsky, *The structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer*. The Journal of biological chemistry, 1993. **268**(24): p. 17651-4.
135. P.D. Good, A.J. Krikos, S.X. Li, E. Bertrand, N.S. Lee, L. Giver, A. Ellington, J.A. Zaia, J.J. Rossi, and D.R. Engelke, *Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei*. Gene therapy, 1997. **4**(1): p. 45-54.
136. C.P. Rusconi, J.D. Roberts, G.A. Pitoc, S.M. Nimjee, R.R. White, G. Quick, Jr., E. Scardino, W.P. Fay, and B.A. Sullenger, *Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo*. Nature Biotechnology, 2004. **22**(11): p. 1423-8.
137. B.J. Hicke and A.W. Stephens, *Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy*. The Journal of Clinical Investigation, 2000. **106**(8): p. 923-928.
138. Y. Lin, A. Padmapriya, K.M. Morden, and S.D. Jayasena, *Peptide conjugation to an in vitro-selected DNA ligand improves enzyme inhibition*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(24): p. 11044-11048.
139. C.E. Tucker, L.-S. Chen, M.B. Judkins, J.A. Farmer, S.C. Gill, and D.W. Drolet, *Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1999. **732**(1): p. 203-212.
140. P.J. Rosenfeld, D.M. Brown, J.S. Heier, D.S. Boyer, P.K. Kaiser, C.Y. Chung, and R.Y. Kim, *Ranibizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration*. New England Journal of Medicine, 2006. **355**(14): p. 1419-1431.
141. J.A. Chapman and C. Beckey, *Pegaptanib: A Novel Approach to Ocular Neovascularization*. The Annals of Pharmacotherapy, 2006. **40**(7): p. 1322-1326.
142. Q. Deng, I. German, D. Buchanan, and R.T. Kennedy, *Retention and Separation of Adenosine and Analogues by Affinity Chromatography with an Aptamer Stationary Phase*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(22): p. 5415-5421.
143. L.W. Dick and L.B. McGown, *Aptamer-Enhanced Laser Desorption/Ionization for Affinity Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(11): p. 3037-3041.

144. L. Barthelmebs, J. Jonca, A. Hayat, B. Prieto-Simon, and J.-L. Marty, *Enzyme-Linked Aptamer Assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine*. *Food Control*, 2011. **22**(5): p. 737-743.
145. I. German, D.D. Buchanan, and R.T. Kennedy, *Aptamers as Ligands in Affinity Probe Capillary Electrophoresis*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(21): p. 4540-4545.
146. S.D. Jayasena, *Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics*. *Clinical Chemistry*, 1999. **45**(9): p. 1628-1650.
147. J. Zheng, W. Feng, L. Lin, F. Zhang, G. Cheng, P. He, and Y. Fang, *A new amplification strategy for ultrasensitive electrochemical aptasensor with network-like thiocyanuric acid/gold nanoparticles*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007. **23**(3): p. 341-347.
148. D. Zhu, J. Luo, X. Rao, J. Zhang, G. Cheng, P. He, and Y. Fang, *A novel optical thrombin aptasensor based on magnetic nanoparticles and split DNAzyme*. *Analytica Chimica Acta*, 2012. **711**(0): p. 91-96.
149. C. He, Y. Long, J. Pan, K. Li, and F. Liu, *Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007. **70**(2): p. 133-150.
150. P. Valérie, *Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques*. *Techniques de l'ingénieur Chromatographie et techniques séparatives*, 2006. **base documentaire : TIB385DUO**(ref. article : p1420).
151. G.J. Soleas, J. Yan, and D.M. Goldberg, *Assay of Ochratoxin A in Wine and Beer by High-Pressure Liquid Chromatography Photodiode Array and Gas Chromatography Mass Selective Detection*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. **49**(6): p. 2733-2740.
152. S. Souverain, S. Rudaz, and J.L. Veuthey, *Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis*. *Journal of Chromatography B*, 2004. **801**(2): p. 141-156.
153. J.-T. Wu, H. Zeng, M. Qian, B.L. Brogdon, and S.E. Unger, *Direct Plasma Sample Injection in Multiple-Component LC-MS-MS Assays for High-Throughput Pharmacokinetic Screening*. *Analytical Chemistry*, 1999. **72**(1): p. 61-67.
154. S. Arrhenius, *Immunochemistry : The Application of the Principles of Physical Chemistry to the Study of Biological Antibodies* New York, The Macmillan company, 1907.
155. D.S. Hage, *Survey of recent advances in analytical applications of immunoaffinity chromatography*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1998. **715**(1): p. 3-28.
156. M.-C. Hennion and V. Pichon, *Immuno-based sample preparation for trace analysis*. *Journal of Chromatography A*, 2003. **1000**(1-2): p. 29-52.



157. H.Z. Senyuva and J. Gilbert, *Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review*. Journal of Chromatography B: Analytical Technology Biomedical Life Sciences, 2010. **878**(2): p. 115-32.
158. A.C. Entwisle, A.C. Williams, P.J. Mann, J. Russell, P.T. Slack, and J. Gilbert, *Combined phenyl silane and immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of ochratoxin A in roasted coffee: collaborative study*. J AOAC International, 2001. **84**(2): p. 444-50.
159. M.-C. Hennion, *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1999. **856**(1-2): p. 3-54.
160. A. Visconti, M. Pascale, and G. Centonze, *Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1999. **864**(1): p. 89-101.
161. G. Prado, M.S. Oliveira, E.P. Carvalho, L.C.O. Lima, T. Veloso, L.A.F. Souza, and A.C.F. Cardoso, *Ochratoxin A determination in beer by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2003. **23**: p. 58-61.
162. E.V. Reiter, M. Cichna-Markl, N. Tansakul, W.-B. Shim, D.-H. Chung, J. Zentek, and E. Razzazi-Fazeli, *Sol-gel immunoaffinity chromatography for the clean up of ochratoxin A contaminated grains*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(42): p. 7627-7633.
163. V. Bascarán, A.H. de Rojas, P. Chouciño, and T. Delgado, *Analysis of ochratoxin A in milk after direct immunoaffinity column clean-up by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Journal of Chromatography A, 2007. **1167**(1): p. 95-101.
164. S.C. Duarte, C.M. Lino, and A. Pena, *Novel IAC-LC-ESI-MS2 analytical set-up for ochratoxin A determination in pork*. Food Chemistry, (0).
165. Y. Ueno, S. Maki, J. Lin, M. Furuya, Y. Sugiura, and O. Kawamura, *A 4-year study of plasma ochratoxin A in a selected population in Tokyo by immunoassay and immunoaffinity column-linked HPLC*. Food and Chemical Toxicology, 1998. **36**(5): p. 445-449.
166. M. Pascale and A. Visconti, *Rapid method for the determination of ochratoxin A in urine by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography*. Mycopathologia, 2001. **152**(2): p. 91-95.
167. C. Alexander, L. Davidson, and W. Hayes, *Imprinted polymers: artificial molecular recognition materials with applications in synthesis and catalysis*. Tetrahedron, 2003. **59**(12): p. 2025-2057.
168. B. Sellergren, *Direct Drug Determination by Selective Sample Enrichment on an Imprinted Polymer*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(9): p. 1578-1582.

169. S. Zhou, E.C. Lai, and J.D. Miller, *Analysis of wheat extracts for ochratoxin A by molecularly imprinted solid-phase extraction and pulsed elution*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004. **378**(8): p. 1903-1906.
170. J.C.C. Yu and E.P.C. Lai, *Determination of ochratoxin A in red wines by multiple pulsed elutions from molecularly imprinted polypyrrole*. *Food Chemistry*, 2007. **105**(1): p. 301-310.
171. N.M. Maier, G. Buttinger, S. Welhartzki, E. Gavioli, and W. Lindner, *Molecularly imprinted polymer-assisted sample clean-up of ochratoxin A from red wine: merits and limitations*. *Journal of Chromatography B*, 2004. **804**(1): p. 103-111.
172. W.H. Ali, D. Derrien, F. Alix, C. Pérollier, O. Lépine, S. Bayouh, F. Chapuis-Hugon, and V. Pichon, *Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymers for selective extraction of a mycotoxin in cereals*. *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(43): p. 6668-6673.
173. Q. Zhao, M. Wu, X. Chris Le, and X.-F. Li, *Applications of aptamer affinity chromatography*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2012. **41**: p. 46-57.
174. T.S. Romig, C. Bell, and D.W. Drolet, *Aptamer affinity chromatography:: combinatorial chemistry applied to protein purification*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1999. **731**(2): p. 275-284.
175. R.B. Kotia, L. Li, and L.B. McGown, *Separation of Nontarget Compounds by DNA Aptamers*. *Analytical Chemistry*, 2000. **72**(4): p. 827-831.
176. J.A. Cruz-Aguado and G. Penner, *Fluorescence polarization based displacement assay for the determination of small molecules with aptamers*. *Analytical Chemistry*, 2008. **80**(22): p. 8853-5.
177. A. De Girolamo, M. McKeague, J.D. Miller, M.C. DeRosa, and A. Visconti, *Determination of ochratoxin A in wheat after clean-up through a DNA aptamer-based solid phase extraction column*. *Food Chemistry*, 2011. **127**(3): p. 1378-1384.
178. X. Wu, J. Hu, B. Zhu, L. Lu, X. Huang, and D. Pang, *Aptamer-targeted magnetic nanospheres as a solid-phase extraction sorbent for determination of ochratoxin A in food samples*. *Journal of Chromatography A*, 2011. **1218**(41): p. 7341-6.
179. S.K. Arya, S. Saha, J.E. Ramirez-Vick, V. Gupta, S. Bhansali, and S.P. Singh, *Recent advances in ZnO nanostructures and thin films for biosensor applications: Review*. *Analytica Chimica Acta*, 2012. **737**(0): p. 1-21.
180. M. Gerard, A. Chaubey, and B.D. Malhotra, *Application of conducting polymers to biosensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2002. **17**(5): p. 345-359.
181. D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, and G.S. Wilson, *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001. **16**(1-2): p. 121-131.

182. S. Viswanathan, H. Radecka, and J. Radecki, *Electrochemical biosensors for food analysis*. Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly, 2009. **140**(8): p. 891-899.
183. O. Kawamura, S. Sato, H. Kajii, S. Nagayama, K. Ohtani, J. Chiba, and Y. Ueno, *A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A based on monoclonal antibodies*. Toxicon, 1989. **27**(8): p. 887-97.
184. L. Sibanda, S. De Saeger, I. Barna-Vetro, and C. Van Peteghem, *Development of a Solid-Phase Cleanup and Portable Rapid Flow-Through Enzyme Immunoassay for the Detection of Ochratoxin A in Roasted Coffee*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(24): p. 6964-6967.
185. B. Giray, S. Atasayar, and G. Sahin, *Determination of ochratoxin A and total aflatoxin levels in corn samples from Turkey by enzyme-linked immunosorbent assay*. Mycotoxin Research, 2009. **25**(2): p. 113-116.
186. A. Zhang, Y. Ma, L. Feng, Y. Wang, C. He, X. Wang, and H. Zhang, *Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China*. Food Control, 2011. **22**(11): p. 1723-1728.
187. A. Radoi, L. Dumitru, L. Barthelmebs, and J.L. Marty, *Ochratoxin A in Some French Wines: Application of a Direct Competitive ELISA Based on an OTA-HRP Conjugate*. Analytical Letters, 2009. **42**(8): p. 1187-1202.
188. A. Fabiani, C. Corzani, and G. Arfelli, *Correlation between different clean-up methods and analytical techniques performances to detect Ochratoxin A in wine*. Talanta, 2010. **83**(1): p. 281-285.
189. Y. Dai, Y. Cai, Y. Zhao, D. Wu, B. Liu, R. Li, M. Yang, Q. Wei, B. Du, and H. Li, *Sensitive sandwich electrochemical immunosensor for alpha fetoprotein based on prussian blue modified hydroxyapatite*. Biosensors and Bioelectronics, 2011. **28**(1): p. 112-116.
190. A.L. Ghindilis, R. Krishnan, P. Atanasov, and E. Wilkins, *Flow-through amperometric immunosensor: fast 'sandwich' scheme immunoassay*. Biosensors and Bioelectronics, 1997. **12**(5): p. 415-423.
191. J. Yuan, D. Deng, D.R. Lauren, M.I. Aguilar, and Y. Wu, *Surface plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin A in cereals and beverages*. Analytica chimica acta, 2009. **656**(1-2): p. 63-71.
192. W.-B. Shim, A.Y. Kolosova, Y.-J. Kim, Z.-Y. Yang, S.-J. Park, S.A. Eremin, I.-S. Lee, and D.-H. Chung, *Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of ochratoxin A*. International Journal of Food Science & Technology, 2004. **39**(8): p. 829-837.
193. V. Lates, C. Yang, I.C. Popescu, and J.L. Marty, *Displacement immunoassay for the detection of ochratoxin A using ochratoxin B modified glass beads*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. **402**(9): p. 2861-70.

194. A.E. Radi, X. Munoz-Berbel, V. Lates, and J.L. Marty, *Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of ochratoxin A*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009. **24**(7): p. 1888-92.
195. L.-G. Zamfir, I. Geana, S. Bourigua, L. Rotariu, C. Bala, A. Errachid, and N. Jaffrezic-Renault, *Highly sensitive label-free immunosensor for ochratoxin A based on functionalized magnetic nanoparticles and EIS/SPR detection*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011. **159**(1): p. 178-184.
196. S.H. Alarcón, L. Micheli, G. Palleschi, and D. Compagnone, *Development of an Electrochemical Immunosensor for Ochratoxin A*. *Analytical Letters*, 2004. **37**(8): p. 1545-1558.
197. B. Prieto-Simón, M. Campàs, J.-L. Marty, and T. Noguer, *Novel highly-performing immunosensor-based strategy for ochratoxin A detection in wine samples*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008. **23**(7): p. 995-1002.
198. S.H. Alarcón, G. Palleschi, D. Compagnone, M. Pascale, A. Visconti, and I. Barna-Vetró, *Monoclonal antibody based electrochemical immunosensor for the determination of ochratoxin A in wheat*. *Talanta*, 2006. **69**(4): p. 1031-1037.
199. L. Bonel, J.C. Vidal, P. Duato, and J.R. Castillo, *Ochratoxin A nanostructured electrochemical immunosensors based on polyclonal antibodies and gold nanoparticles coupled to the antigen*. *Analytical Methods*, 2010. **2**(4): p. 335-341.
200. A.-E. Radi, X. Muñoz-Berbel, M. Cortina-Puig, and J.-L. Marty, *An electrochemical immunosensor for ochratoxin A based on immobilization of antibodies on diazonium-functionalized gold electrode*. *Electrochimica Acta*, 2009. **54**(8): p. 2180-2184.
201. M. Heurich, M.K.A. Kadir, and I.E. Tothill, *An electrochemical sensor based on carboxymethylated dextran modified gold surface for ochratoxin A analysis*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011. **156**(1): p. 162-168.
202. X.-P. Liu, Y.-J. Deng, X.-Y. Jin, L.-G. Chen, J.-H. Jiang, G.-L. Shen, and R.-Q. Yu, *Ultrasensitive electrochemical immunosensor for ochratoxin A using gold colloid-mediated haptin immobilization*. *Analytical Biochemistry*, 2009. **389**(1): p. 63-68.
203. P.R. Perrotta, F.J. Arévalo, N.R. Vettorazzi, M.A. Zón, and H. Fernández, *Development of a very sensitive electrochemical magneto immunosensor for the direct determination of ochratoxin A in red wine*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012. **162**(1): p. 327-333.
204. M.A. Fernández-Baldo, F.A. Bertolino, G.A. Messina, M.I. Sanz, and J. Raba, *Modified magnetic nanoparticles in an electrochemical method for the ochratoxin A determination in *Vitis vinifera* red grapes tissues*. *Talanta*, 2010. **83**(2): p. 651-657.
205. N. Adanyi, I.A. Levkovets, S. Rodriguez-Gil, A. Ronald, M. Varadi, and I. Szendro, *Development of immunosensor based on OWLS technique for determining Aflatoxin B1 and Ochratoxin A*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007. **22**(6): p. 797-802.

206. R. Khan, N.C. Dey, A.K. Hazarika, K.K. Saini, and M. Dhayal, *Mycotoxin detection on antibody-immobilized conducting polymer-supported electrochemically polymerized acacia gum*. *Analytical Biochemistry*, 2011. **410**(2): p. 185-90.
207. Y. Ito, S. Fujita, N. Kawazoe, and Y. Imanishi, *Competitive Binding Assay for Thyroxine Using in Vitro Selected Oligonucleotides*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(16): p. 3510-3512.
208. R.A. Potyrailo, R.C. Conrad, A.D. Ellington, and G.M. Hieftje, *Adapting Selected Nucleic Acid Ligands (Aptamers) to Biosensors*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(16): p. 3419-3425.
209. S. Song, L. Wang, J. Li, C. Fan, and J. Zhao, *Aptamer-based biosensors*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2008. **27**(2): p. 108-117.
210. A.K. Cheng, D. Sen, and H.Z. Yu, *Design and testing of aptamer-based electrochemical biosensors for proteins and small molecules*. *Bioelectrochemistry*, 2009. **77**(1): p. 1-12.
211. J.A. Hansen, J. Wang, A.-N. Kawde, Y. Xiang, K.V. Gothelf, and G. Collins, *Quantum-Dot/Aptamer-Based Ultrasensitive Multi-Analyte Electrochemical Biosensor*. *Journal of the American Chemical Society*, 2006. **128**(7): p. 2228-2229.
212. H. Kuang, W. Chen, D. Xu, L. Xu, Y. Zhu, L. Liu, H. Chu, C. Peng, C. Xu, and S. Zhu, *Fabricated aptamer-based electrochemical "signal-off" sensor of ochratoxin A*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010. **26**(2): p. 710-716.
213. L. Barthelmebs, A. Hayat, A.W. Limiadi, J.-L. Marty, and T. Noguer, *Electrochemical DNA aptamer-based biosensor for OTA detection, using superparamagnetic nanoparticles*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011. **156**(2): p. 932-937.
214. L. Bonel, J.C. Vidal, P. Duato, and J.R. Castillo, *An electrochemical competitive biosensor for ochratoxin A based on a DNA biotinylated aptamer*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. **26**(7): p. 3254-9.
215. N. Prabhakar, Z. Matharu, and B.D. Malhotra, *Polyaniline Langmuir-Blodgett film based aptasensor for ochratoxin A detection*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. **26**(10): p. 4006-11.
216. P. Tong, L. Zhang, J.J. Xu, and H.Y. Chen, *Simply amplified electrochemical aptasensor of ochratoxin A based on exonuclease-catalyzed target recycling*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. **29**(1): p. 97-101.
217. A. Hayat, A. Sassolas, J.-L. Marty, and A.-E. Radi, *Highly sensitive ochratoxin A impedimetric aptasensor based on the immobilization of azido-aptamer onto electrografted binary film via click chemistry*. *Talanta*, 2013. **103**(0): p. 14-19.
218. Z. Wang, N. Duan, X. Hun, and S. Wu, *Electrochemiluminescent aptamer biosensor for the determination of ochratoxin A at a gold-nanoparticles-modified gold electrode*

- using *N*-(aminobutyl)-*N*-ethylisoluminol as a luminescent label. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010. **398**(5): p. 2125-32.
219. A. Holmberg, A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundeberg, and M. Uhlén, *The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures*. *ELECTROPHORESIS*, 2005. **26**(3): p. 501-510.
220. B. Madru, F. Chapuis-Hugon, and V. Pichon, *Novel extraction supports based on immobilised aptamers: evaluation for the selective extraction of cocaine*. *Talanta*, 2011. **85**(1): p. 616-24.
221. A. Visconti, M. Pascale, and G. Centonze, *Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 2000. **888**(1-2): p. 321-326.
222. C. Tessini, C. Mardones, D. von Baer, M. Vega, E. Herlitz, R. Saelzer, J. Silva, and O. Torres, *Alternatives for sample pre-treatment and HPLC determination of Ochratoxin A in red wine using fluorescence detection*. *Analytica Chimica Acta*, 2010. **660**(1-2): p. 119-26.
223. C. Juan, C.M. Lino, A. Pena, J.C. Molto, J. Manes, and I. Silveira, *Determination of ochratoxin A in maize bread samples by LC with fluorescence detection*. *Talanta*, 2007. **73**(2): p. 246-50.
224. B. Zimmerli and R. Dick, *Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 1995. **666**(1): p. 85-99.
225. R. Serra, C. Mendonça, L.s. Abrunhosa, A. Pietri, and A. Venâncio, *Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation*. *Analytica Chimica Acta*, 2004. **513**(1): p. 41-47.
226. M. Castegnaro, M. Tozlovanu, C. Wild, A. Molinié, A. Sylla, and A. Pfohl-Leszkowicz, *Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2006. **50**(6): p. 480-487.
227. C. Yang, Y. Wang, J.L. Marty, and X. Yang, *Aptamer-based colorimetric biosensing of Ochratoxin A using unmodified gold nanoparticles indicator*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. **26**(5): p. 2724-7.
228. C. Yang, V. Lates, B. Prieto-Simon, J.L. Marty, and X. Yang, *Aptamer-DNAzyme hairpins for biosensing of Ochratoxin A*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012. **32**(1): p. 208-12.
229. Z. Chen, L. Li, X. Mu, H. Zhao, and L. Guo, *Electrochemical aptasensor for detection of copper based on a reagentless signal-on architecture and amplification by gold nanoparticles*. *Talanta*, 2011. **85**(1): p. 730-5.

230. A. Paul, M. Avci-Adali, G. Ziemer, and H.P. Wendel, *Streptavidin-coated magnetic beads for DNA strand separation implicate a multitude of problems during cell-SELEX*. *Oligonucleotides*, 2009. **19**(3): p. 243-54.

## ملخص

من السموم الفطرية ما يعرف بالإوكراتوكسين وهو عبارة عن سُم ذي بنية مكلورة أحادية الكومارين، تنتجها بعض الرِّشاشيات أو المِكنسيات وقد تم عزل هذا السم في العديد من المنتجات. سمية الإوكراتوكسين تكمن في تأثيره السلبي على صحة الإنسان والحيوان حتى ولو تم استهلاكه بكميات ضئيلة جداً، فهو ماسخ، ومثلف للكلى وللنسيج العصبي، كما تم تصنيفه ضمن المواد المسرطنة "مجموعة 2 - B أي الممكن أن تكون مسرطنة للإنسان". نظراً لخطورة هذا المركب، فقد صدرت توجيهات عديدة تهدف إلى الحد من تواجده في مختلف المواد الغذائية. ولتفعيل هذه التوجيهات ضمن المعايير الأوروبية المعنية بضمان الأمن الغذائي، فقد تم تحديث وتطوير طرائق تحليلية تعتمد على تقنية الاستشراب (الكروماتوغرافي).

على الرغم من فعالية هذه الطرائق التقليدية، فهي مكلفة جدا وتتطلب وجود اختصاصيين عاليي التأهيل ، مما استلزم تطوير طرائق بديلة وتقنيات جديدة تعتمد بمجملها على الطرائق الكيميائية. تقوم هذه الطرائق على الكشف عن الاوكراتوكسين كعامل مستضاد من خلال دراسة تفاعله مع جسم مضاد عبر آلية تعرف جزيئي ونوعي تؤدي إلى تغير قابل للقياس. نستعمل في هذا العمل الأبتمرات كعنصر تعرف.

الأبتمر هو عبارة عن سلسلة قصيرة من حمض نووي ريبوي منقوص الأكسجين أو حمض ريبوي نووي أحادي أو ثنائي الصيغة هذه السلسلة تتم هندستها داخل المختبر وخارج الخلية الحية وفق مراحل متعددة من الاختيار مرتبطة بقدرتها على التعرف على الهدف، وهو ما يعرف بالسيليكر (التطور المنهجي للمعقدات عن طريق التخصيب الأسي).

الهدف من هذا العمل هو تطوير طرائق تحليلية جديدة تعتمد على الأبتمر للكشف عن الأوكراتوكسين في المواد الغذائية. وقد تم وضع طريقتين متكاملتين لتقصي هذا السم: الأولى من أجل استخلاصه من العينات الغذائية بتقنية الامتزاز على عمود يحوي الأبتمر.

والثانية من أجل تحديد كميته بالاعتماد على مستشعرات حيوية ابتميرية مدمجة الى نظام تدفق أوتوماتيكي بعد البحث المخبري وإيجاد الشروط المثلى لعمل كل من الطريقتين ، فقد تم تطبيقهما بنجاح على عينات من البيرة . وتبين بالتجربة إمكانية الكشف عن تراكيز من الاوكراتوكسين أخفض بكثير من المعايير التي وضعتها المفوضية الأوروبية للأمن الغذائي، كما تم التحقق من انتقاء أثر المصفوفة في مردود الكشف عن هذا السم في العينات الفعلية.

## مصطلحات مفتاحية:

السموم الفطرية، إوكراتوكسين، أبتمير، سيليكر، عمود امتياز أبتميري، مستشعرات حيوية أبتميرية.



# *Abstract*

Ochratoxin A (OTA), an isocoumarinic mycotoxin produced by the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, is a common contaminant of several foodstuffs. Even in trace amounts, OTA has adverse effects on human and animal health: nephrotoxic, teratogenic, neurotoxic, immunosuppressive and it was considered by the international Agency of Research on Cancer (IARC) as a potential carcinogenic agent (group 2B). In order to meet food safety concerns and official legislated regulations, analytical methods, mainly based on chromatographic techniques, have been reported for OTA detection. Despite their effectiveness, these techniques remain expensive and require qualified skilled personnel, alternatives strategies are emerging and novel technologies based on biochemical methods. These techniques are based on the interaction target-recognition element. We use in this work, a new class of biomolecules called aptamers. They are single or double stranded DNA or RNA, selected by their ability to recognise a target, by a combinatorial method of selection *in vitro* called SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment). The aim of this work is the development of new methods based on aptamers for OTA determination in foodstuffs. We will develop two methods, one method for extraction and another one for detection. The first one consists in an aptamer-based affinity column or oligosorbent. This device of extraction was evaluated in term of retention, specificity, selectivity and regeneration. While the second is based on an aptasensor developed in a fully automated system. All the optimizations and manipulations were performed using automated sequences. After optimizations, these two methods are applied for OTA determination in real beer samples. The obtained limits of detection are much lower than the maximum tolerated levels of OTA in set by the European commission. Also, the high recovery yields obtained show the good applicability of the developed oligosorbent and aptasensor in real sample without matrices effect.

**Keywords:** *Mycotoxines, OTA, aptamers, SELEX, oligosorbent, aptasensors*

## Résumé

L'ochratoxine A ou OTA, mycotoxine de structure isocoumarinique chlorée, produite par les genres *Aspergillus* et *Penicillium*, est un contaminant de plusieurs produits alimentaires. Même à l'état de traces, l'OTA possède des effets néfastes sur la santé humaine et animale: effets néphrotoxiques, tératogènes, immunosuppressives, neurotoxiques et cancérigènes du groupe 2B (l'OTA a été considérée par l'IARC comme un cancérigène possible pour l'homme). Pour éviter ces problèmes de santé publique, plusieurs directives préconisent de limiter la présence de l'OTA dans divers aliments. Dans le but d'assurer la sécurité alimentaire et par respect des normes européennes, plusieurs méthodes analytiques, principalement basées sur des techniques chromatographiques, ont vu le jour. Malgré leur efficacité, ces méthodes demeurent très coûteuses et nécessitent un personnel qualifié, d'où l'intérêt de développer de nouvelles technologies basées sur les méthodes biochimiques. Le principe de ces techniques est basé sur une interaction molécule cible-élément de reconnaissance. On utilise dans ce travail de thèse une nouvelle classe de molécules appelées : les aptamères. Ce sont des séquences oligonucléotidiques ADN ou ARN simple ou double brins, sélectionnés selon leur aptitude à reconnaître une cible par une méthode combinatoire de sélection *in vitro* appelée SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment). L'objectif du présent travail est de développer de nouvelles méthodes à base d'aptamères pour la détermination de l'OTA dans les denrées alimentaires. Nous allons mettre au point deux méthodes: une méthode d'extraction et une méthode de détection. La première consiste en un oligoadsorbant ou colonnes d'affinité à base d'aptamères. La performance de cet outil d'extraction est évaluée en termes de rétention, spécificité, sélectivité et régénération. La seconde méthode est basée sur un aptacapteur développé dans un système entièrement automatisé en flux où toutes les manipulations et les optimisations sont effectuées par des séquences automatiques. Après optimisation, ces méthodes sont appliquées sur des échantillons réels de bière. Les limites de détection obtenues sont beaucoup inférieures aux normes fixées par la Commission Européenne. Les limites de détection et les rendements obtenus ont pu démontrer la faisabilité ainsi que l'intérêt potentiel de telles techniques analytiques pour des échantillons réels sans effets de matrice.

**Mots clés :** *Mycotoxines, OTA, aptamères, SELEX, oligoadsorbant, aptacapteur.*