HAL
open science

Validation et optimisation d'une nouvelle méthode de détection des adénovirus humains

Brice Sanchez

To cite this version:

Brice Sanchez. Validation et optimisation d'une nouvelle méthode de détection des adénovirus humains. Microbiologie et Parasitologie. 2019. hal-02550745

HAL Id: hal-02550745

https://hal.univ-lorraine.fr/hal-02550745

Submitted on 22 Apr 2020

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Master MIC 2ème année

MES
Microbiologie Environnementale et Sanitaire

Année Universitaire 2018/2019

Validation et optimisation d'une nouvelle méthode de détection des adénovirus humains

Mémoire présenté par

SANCHEZ Brice

Stage effectué du 11 Février au 9 Août 2019

Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST)

Département Environmental Research and Innovation (ERIN)

Encadré par OGORZALY Leslie, Research and Technology Associate

Remerciements

Je remercie M. Henry-Michel Cauchie, responsable de l'unité Microbiologie Environnementale et Biotechnologies, de m'avoir accueilli au sein de son équipe pour la réalisation de mon stage de master 2, ainsi que Mme Leslie Ogorzaly, mon encadrante de stage, pour ses nombreux conseils et pour son aide précieuse lors de la rédaction du rapport et également pour son soutien et sa sympathie durant ces 6 mois de stage.

Je remercie également M. Lucien Hoffmann, directeur scientifique du département Environmental Research and Innovation (ERIN) de m'avoir permis de réaliser mon stage au sein de son département.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe Microbiologie pour leur bonne humeur, leur sympathie ainsi que leur disponibilité. En particulier, j'aimerais remercier Laetitia, Delphine et Cécile pour leurs conseils et leur aide précieuse. Ces 6 mois passés au LIST ont été pour moi une expérience très enrichissante et valorisante. Merci beaucoup du temps que vous m'avez consacré et des connaissances que vous m'avez transmises.

J'ai également une pensée pour tous les doctorants et stagiaires avec qui j'ai eu le plaisir de faire connaissance et qui ont rendu mon expérience encore plus agréable. Bon courage à vous Mariem, Perrine et Maureen, je suis sûr que vos projets seront couronnés de succès !

Abréviations

6-FAM : 6-Carboxyfluorescine

BSA : Albumine de sérum bovin (Bovine Serum Albumin)

DO : Densité optique

ELASA : Enzyme-Linked Aptamer Sorbent Assay

ELISA : Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay

FBS : Fetal Bovine Serum

HAdV : Adénovirus humains

HAdV-2 : Adénovirus humains de type 2

HRP : Horseradish Peroxidase (Peroxydase de raifort)

PBS : Tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Saline)

PCR : Polymerase Chain Reaction

qPCR : PCR quantitative

NPPUC : Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathogènes

TMB : Tétraméthylbenzidine

Sommaire

Etude bibliographique

I/ Les virus transmis par voie hydrique 1

A] L'eau et ses contaminants 1

C] Méthodes de détection des virus 4

II/ Les aptamères et leurs applications *6*

A] Qu'est-ce qu'un aptamère ? 6

B] Méthodes actuelles utilisant les aptamères 7

C] Quel avenir pour les aptamères ? 9

III/ Le contexte du stage *10*

A] LIST 10

B] Les objectifs du stage 10

Matériel et méthodes

I/ Culture cellulaire - lignées cellulaires A549 (cellules de poumon cancéreuses) et 293A (cellules de rein humain) : *11*

A) Entretien des lignées cellulaires 11

B) Infection des cellules et récolte des Adénovirus humains de type 2 : 12

C) Purification des HAdV-2 : 12

D) Quantification des HAdV-2 : 13

II/ Aptamères *13*

A) Production des aptamères 13

B) Structures et séquences 14

III/ Enzyme-Linked AptamerSorbent Assay (ELASA): *14*

A) Principe 14

B) Protocole général 14

C) Conditions des tests effectués 15

D) Traitement des données 16

Résultats

I/ Caractérisation des aptamères et du témoin négatif *17*

A) Caractérisation des aptamères candidats 17

B) Caractérisation du témoin négatif 17

II/ Constantes de dissociation : ____ *19*

III/ Sensibilité de détection : ____ *19*

A) ELASA ____ **19**

B) Virus infectieux ____ **20**

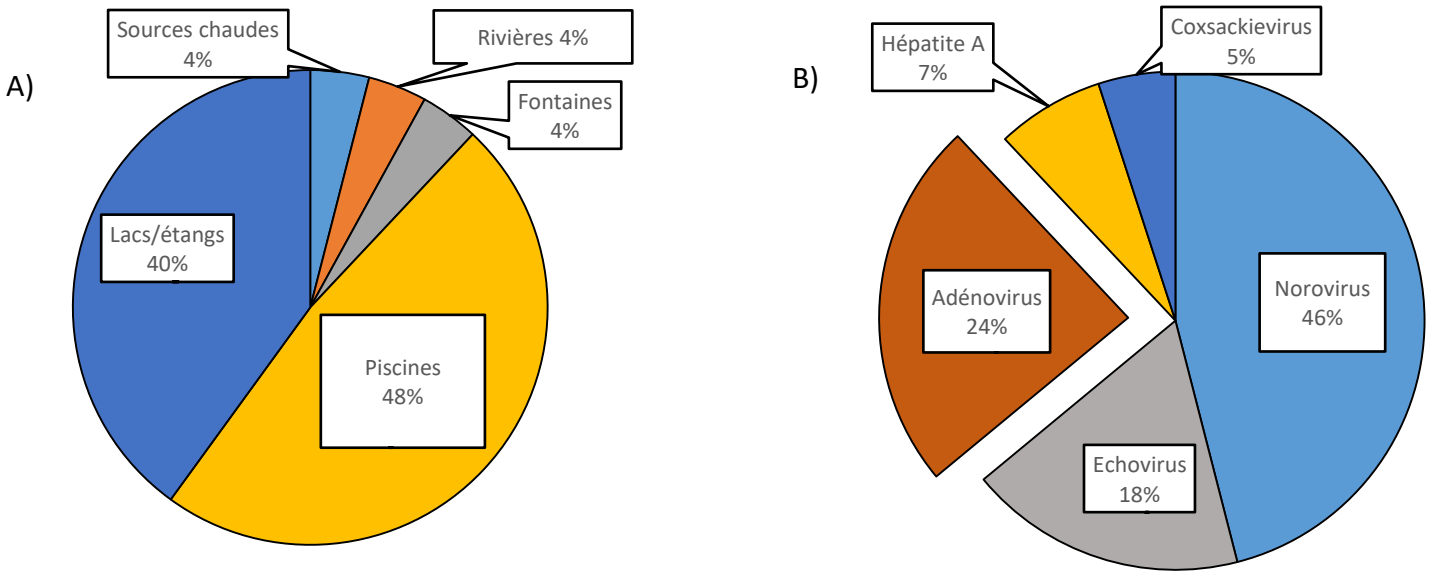
C) Spécificité ____ **21**

Discussion-Perspectives-Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Etude bibliographique



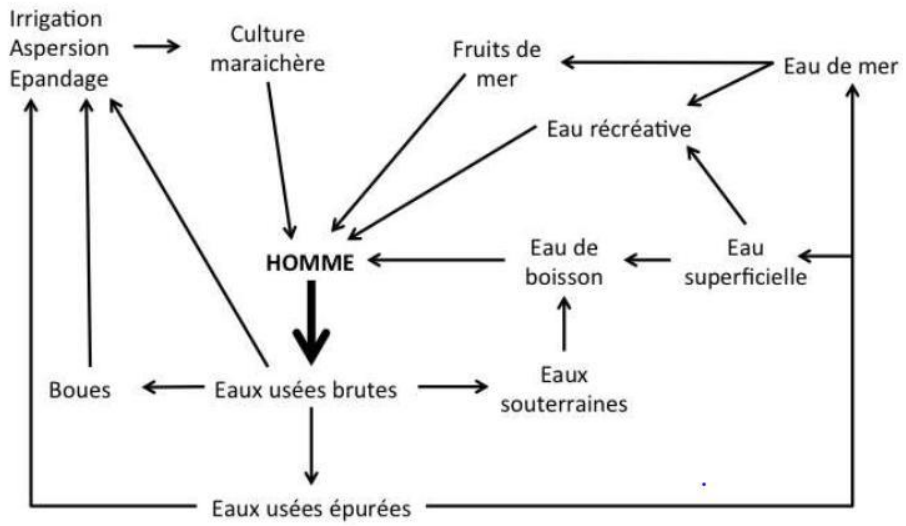
<u>Figure 1:</u> Répartition des épidémies virales liées aux eaux récréatives en fonction du type d'eau (A) et de l'agent étiologique (B) (adapté de Sinclair *et al*, 2009).

I/ Les virus transmis par voie hydrique

A] L'eau et ses contaminants

Les virus font partie des nombreux composants biologiques retrouvés dans l'eau, en particulier les eaux brutes (qui alimentent les stations de production d'eau potable) et eaux usées. Malgré la présence de ces virus dans l'eau, ce sont sur des indicateurs bactériens, historiquement ; la présence d' *Escherichia coli* (*E. coli*), que reposent les critères de qualité de l'eau (OMS, 2017). La présence et la concentration de ces indicateurs bactériens permettent d'évaluer ainsi le niveau de contamination éventuelle des eaux. Ces critères de qualité sont très stricts, en particulier concernant l'eau de consommation. Cependant, les moyens techniques nécessaires à l'obtention d'une eau potable ne sont pas toujours accessibles pour toutes les populations dans le monde. En 2017, 3 personnes sur 10, soit 2,1 milliards de personnes n'avaient pas accès à l'eau potable [OMS/Unicef, 2017]. Ces populations consomment une eau non traitée pouvant contenir des bactéries, des protozoaires et des virus, généralement d'origine fécale, qui peuvent causer une grande diversité de maladies, en particulier des gastroentérites. Les systèmes de potabilisation (chloration, UV) se focalisent donc sur l'élimination des indicateurs bactériens pour rendre l'eau consommable par les populations.

Par ailleurs, il a été démontré que certaines eaux, pourtant dénuées de ces indicateurs et donc répondant aux critères de qualité, se sont plus tard révélées comme étant liées à des épidémies virales [Wyer *et al*, 2012 ; Li *et al*, 2018]. Les virus semblent ainsi fortement impliqués dans les épidémies liées au contact avec des eaux récréatives où l'on pratique la nage et des sports aquatiques [Sinclair *et al*, 2009] (Figure 1A). Les lacs et les piscines constituent les principaux lieux de contamination dû à l'absence ou au dysfonctionnement de systèmes de traitement des eaux. Les deux principaux virus responsables d'épidémies virales sont les norovirus (46%) et les adénovirus (24%) (Figure 1B). On observe alors des cas de troubles gastro-intestinaux, des infections oculaires, auriculaires ou encore respiratoires. La corrélation entre la présence d'indicateurs bactériens et les risques sanitaires n'est donc pas toujours possible à valider en présence de virus [Li *et al*, 2018]. Il semble donc de la plus haute importance d'établir une surveillance de la présence et de la concentration des virus dans les eaux environnementales dans le but de prévoir et d'empêcher des épidémies virales liées au contact avec de l'eau contaminée [Rames *et al*, 2016 ; Verani *et al*, 2018].



<u>Figure 2</u>: Cycle de contamination et voies de transmission des virus dans le milieu hydrique (adapté de Schwarztbrod, 1991).

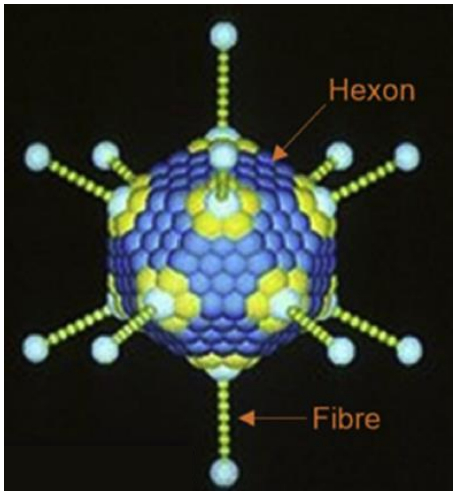
Les virus diffèrent nettement des bactéries utilisées comme indicateurs de contamination. Ils sont notamment plus petits que les bactéries et échappent donc à certains systèmes de filtration. Ils sont aussi capables de résister plus longtemps dans l'environnement et peuvent être détectés sur une très longue période de temps après l'évènement de contamination [Jiang, 2006 ; Ogorzaly *et al*, 2010]. Certains virus montrent même une grande capacité de résistance aux traitements UV utilisés dans les systèmes de potabilisation de l'eau ; c'est le cas en particulier des adénovirus humains [Gerba *et al*, 2002]. Toutes ces caractéristiques font des virus une menace dans le cadre de la production d'eau potable puisqu'ils sont susceptibles de résister aux traitements et de se retrouver dans l'eau du réseau de distribution. Mais le problème ne s'arrête pas qu'à la consommation d'eau, les aérosols produits par les douches, les fontaines et les piscines sont aussi vecteurs de virus et participent à leur propagation.

De par leur forte morbidité et létalité, les virus ont été inscrits dans la CCL-4 de 2016 (pour Contaminant Candidate List), une liste établie par l' « Environmental Protection Agency (US) » qui regroupe les contaminants que l'on peut retrouver dans l'eau de distribution. Cette liste présente les priorités dans la recherche de moyens de détection et d'élimination de ces contaminants. Par la suite, ces contaminants seront incorporés dans les critères de qualité de l'eau. Les virus entériques tels que les norovirus, les entérovirus et les adénovirus représentent en effet un problème de santé majeur. Ils sont excrétés en grandes concentrations dans les selles des individus infectés (jusqu'à 10^{11} virus/selles), qu'ils présentent ou non des symptômes. On les retrouve ainsi en quantité significative dans les eaux environnementales à travers le déversement des eaux usées (traitées ou non) ou par ruissellement (Figure 2).

Si le contrôle de la présence d'*E. coli* se fait de manière routinière dans les infrastructures de traitement des eaux, cela n'est pas le cas pour la présence de virus. Les méthodes actuelles de détection des virus dans l'eau passent par des techniques qui mobilisent du temps, du matériel et du personnel qualifié. De plus, les méthodes de détection moléculaire comme la PCR qui sont généralement utilisées, ne sont pas en mesure de différencier les virus infectieux des virus non infectieux. De nouvelles méthodes de détection ont ainsi permis de révéler que certains virus pouvaient persister de manière prolongée dans l'environnement tout en gardant leur capacité d'infection [Ogorzaly *et al*, 2010]. Fongaro *et al* (2013) ont, par exemple, étudié la viabilité des adénovirus humains dans des sources d'eau potable. Leur étude ayant révélé la présence de virus infectieux sur les sites testés, les auteurs appellent à une sensibilisation des

Sérotypes HAdV	Maladies	Groupes touchés
3, 7	Infection disséminée létale	Nouveau-nés
1, 2, 3, 5, 7	Pharyngite, Coryza	Nourrissons
3, 7, 14	Fièvre pharyngoconjonctivale	Enfants
1, 2, 3, 4, 6, 7, 14	Maladie des voies respiratoires supérieures, pneumonie	Enfants
2, 3, 5, 31, 40, 41	Gastroentérite	Enfants
1, 2, 4, 5	Intussusception	Enfants
3, 5, 6, 7, 12	Méningo-encéphalite	Enfants, Immunodéprimés, greffés
34, 35	Cystite hémorragique	Enfants (garçons), Immunodéprimés, greffés
3, 4, 7, 14	Maladie respiratoire aigüe	Recrues militaires, adultes
10, 15, 22-29, 34, 37	Kératoconjonctivite epidémique	Tous âges
5, 31, 34, 35, 45, 46	Pneumonie	Immunodéprimés
14, 34, 35	Infections du tract urinaire	Immunodéprimés
7, 12	Maladie du SNC, encéphalites	Immunodéprimés

<u>Tableau 1:</u> Maladies causées par les adénovirus humains selon le sérotype viral et groupes de personnes les plus vulnérables à ce type d'infection (adapté de Rames *et al*, 2016).



<u>Figure 3:</u> Structure schématisée d'un adénovirus (adapté de Rames *et al*, 2016).

autorités sanitaires concernant le problème de santé posé par ces virus dans les ressources en eau.

B] Les adénovirus humains

Parmi les virus entériques, les adénovirus humains (HAdV) ont reçu une attention particulière car ils sont responsables d'un grand nombre de maladies (Tableau 1), comme des gastroentérites, des kératoconjonctivites et des maladies respiratoires (en particulier, des pneumonies). Ils représentent la deuxième cause d'épidémies virales dans le monde, la première cause étant les norovirus. Les personnes fragiles sont particulièrement à risque comme les enfants, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées. En effet, ces virus sont à l'origine de nombreux cas de pneumonies (4 à 10% des cas sont causés par HAdV) et de gastroentérites chez les enfants et représentent un danger particulier pour les immunodéprimés [Echavarria, 2008]. Les HAdV sont des virus non enveloppés d'environ 100 nm, icosaédriques (Figure 3), à ADN double brin et font partie de la famille des *Adenoviridae* et du genre des *Mastadenovirus* qui regroupe sept espèces d'HAdV. On recense à ce jour plus de 60 sérotypes humains [Ghebremedhin, 2014]. D'ailleurs, la sévérité des infections dépend notamment du type d'HAdV infectant le patient [Koren, 2016 ; Fu *et al*, 2019]. Récemment, l'HAdV de type 14 s'est révélé être particulièrement virulent, touchant même gravement le système respiratoire d'adultes en parfaite santé [Kajon *et al*, 2010]. Il est donc parfois difficile de déterminer rapidement et efficacement l'origine des symptômes présentés par les patients. A partir de ce constat, il devient alors essentiel de prévenir ces infections en contrôlant plus efficacement la présence des HAdV dans l'eau. Le sérotype le plus répandu dans les eaux usées et les eaux de surface est l'adénovirus 41 (HAdV-41) et touche particulièrement les enfants.

En effet, la propagation des HAdV se fait via le milieu hydrique, notamment par l'excrétion des individus infectés même s'ils ne présentent pas de symptôme. Ainsi, à travers le rejet d'eaux usées ou encore par ruissellement des eaux de pluie, on retrouve ces virus dans les rivières, les piscines mais aussi dans l'eau de boisson [Lee *et* al, 2003 ; Van Heerden *et al*, 2003 ; Gall *et al*, 2015]. Les eaux de récréation sont une source d'inquiétudes majeure car vecteurs de nombreux virus et responsables d'épidémies d'infections à adénovirus [Li *et al*, 2018]. Les HAdV de types 3, 4 et 7 sont notamment connus pour être propagés par le biais de gouttelettes et pénètrent ainsi dans le système respiratoire [Sinclair *et al*, 2009]. Les lieux tels que les piscines ou les lacs forment un

terrain propice où les individus peuvent être exposés aux virus. De plus, les HAdV sont résistants à certains traitements de potabilisation, c'est le cas notamment avec le traitement aux UV ce qui peut s'expliquer par le fait que les adénovirus sont composés d'un double brin d'ADN [Gerba *et al*, 2002]. Il est donc essentiel de mettre au point des méthodes de détection plus efficaces dans le cadre de l'amélioration des techniques de traitement des eaux [Ryu, 2015].

En raison de toutes ces caractéristiques, les HAdV pourraient potentiellement se révéler être de très bons indicateurs de pollution fécale et virale des eaux. En effet, les HAdV jouent déjà le rôle d'indicateurs de l'efficacité des traitements UV dans certains pays en raison de leur forte résistance à ces traitements [US EPA, 2006]. Sans pour autant remplacer entièrement les indicateurs bactériens, la détection et la quantification de la concentration d'HAdV permettraient de déterminer la qualité des eaux et d'adapter les traitements de potabilisation. Plusieurs études ont étudié l'existence d'un lien entre les indicateurs bactériens de pollution fécale et les HAdV [Ogorzaly *et al*, 2009 ; Wyer *et al*, 2012 ; Verani *et al*, 2018]. Il s'est révélé que les HAdV suivent la même tendance de concentration que les indicateurs bactériens et peuvent être détectés en absence d'indicateurs bactériens en raison de leur persistance dans l'environnement. Verani *et al* (2018), ont évalué la possibilité d'utiliser les HAdV en tant qu'indice de contamination dans le cadre d'un modèle d'Evaluation Quantitative du Risque Microbien., Les auteurs n'ont pas obtenu de corrélation statistique entre la présence d'HAdV et la présence d'indicateurs bactériens, confirmant ainsi la nécessité de considérer les HAdV comme des indicateurs à part entière. Les auteurs ont cependant de nombreuses incertitudes concernant ce modèle en particulier à cause de la méthode de détection utilisée qui ne permet pas de faire la différence entre les virus infectieux et les virus non infectieux.

C] Méthodes de détection des virus

De manière générale, les virus sont présents en relativement faibles quantités dans l'environnement. Pour éviter d'avoir à traiter des dizaines de litres d'échantillons, il est nécessaire de passer par une étape de concentration des échantillons. Cette dernière est cruciale dans la détection des virus [Haramoto *et al,* 2018]. De précédentes études ont donc utilisé des techniques basées sur l'adsorption et élution de virus, l'exclusion stérique ainsi que l'ultrafiltration pour la concentration de leurs échantillons. La difficulté de cette étape dépend du ou des virus ciblés, du type d'échantillon et de la technique utilisée, pouvant amener à des résultats très variables.

Pour la détection de virus, la technique la plus ancienne, qui reste encore utilisée à ce jour, est celle de la culture cellulaire. Cette technique possède cependant de nombreux inconvénients : elle demande du temps, du savoir-faire et de l'équipement adapté. Cependant cette technique a rapidement été remplacée par des techniques moléculaires : la PCR et la qPCR. Ces méthodes permettent un délai de détection beaucoup plus court (quelques heures pour la PCR contre plusieurs semaines pour la culture cellulaire), ainsi qu'une grande spécificité mais surtout, permettent de détecter des virus qui ne sont pas cultivables [Echavarria *et al*, 1998]. Cependant, la PCR est sensible à des substances inhibitrices comme les acides humiques, souvent concentrées en même temps que les virus et qui perturbent ainsi les techniques de détection [Haramoto *et al,* 2018]. Une autre technique de détection, permettant dans certains cas d'éviter l'étape de concentration, est la digital PCR (dPCR) qui permet de quantifier de manière directe les acides nucléiques d'un échantillon. Cette méthode consiste à fractionner un échantillon en réalisant en parallèle de multiples PCR sur une microplaque et offre une plus grande résistance aux inhibiteurs de PCR [Fraisse *et al*, 2017]. L'inconvénient majeur de toutes ces méthodes moléculaires est qu'elles ne peuvent pas différencier les virus infectieux des virus non infectieux. L'Integrated Cell Culture-PCR (ICC-PCR) a ainsi été développée, elle permet de détecter des virus infectieux de manière plus rapide que par la culture cellulaire classique [Ogorzaly *et al*, 2013a ; Ryu *et al*, 2015]. Enfin, d'autres techniques, plus récentes, basées sur le pyroséquençage sont par exemple utilisées lors d'épidémies, pour retrouver l'origine de la contamination ou encore d'identifier le sérotype du virus dans le cadre d'un diagnostic [Sarantis *et al,* 2004 ; Lamson *et al*, 2017].

Enfin, une autre catégorie de méthode de détection des virus repose sur l'utilisation d'anticorps. Ainsi le Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRi) permet l'observation de la liaison d'un ligand sur un récepteur, comme un anticorps par exemple, adsorbé sur une surface. Une étude a ainsi pu détecter des adénovirus de manière indirecte avec un dispositif sensible, réutilisable et rapide [Abadian *et al*, 2015]. D'autres techniques à base d'anticorps (ELISA, immunofluorescence, agglutination) permettent aussi une détection sensible mais ne sont utilisables que dans le cas où les sérotypes des virus sont caractérisés et les anticorps ont été produits. Ainsi, ces méthodes ne concernent en général que des échantillons cliniques qui contiennent donc un grand nombre de virus.

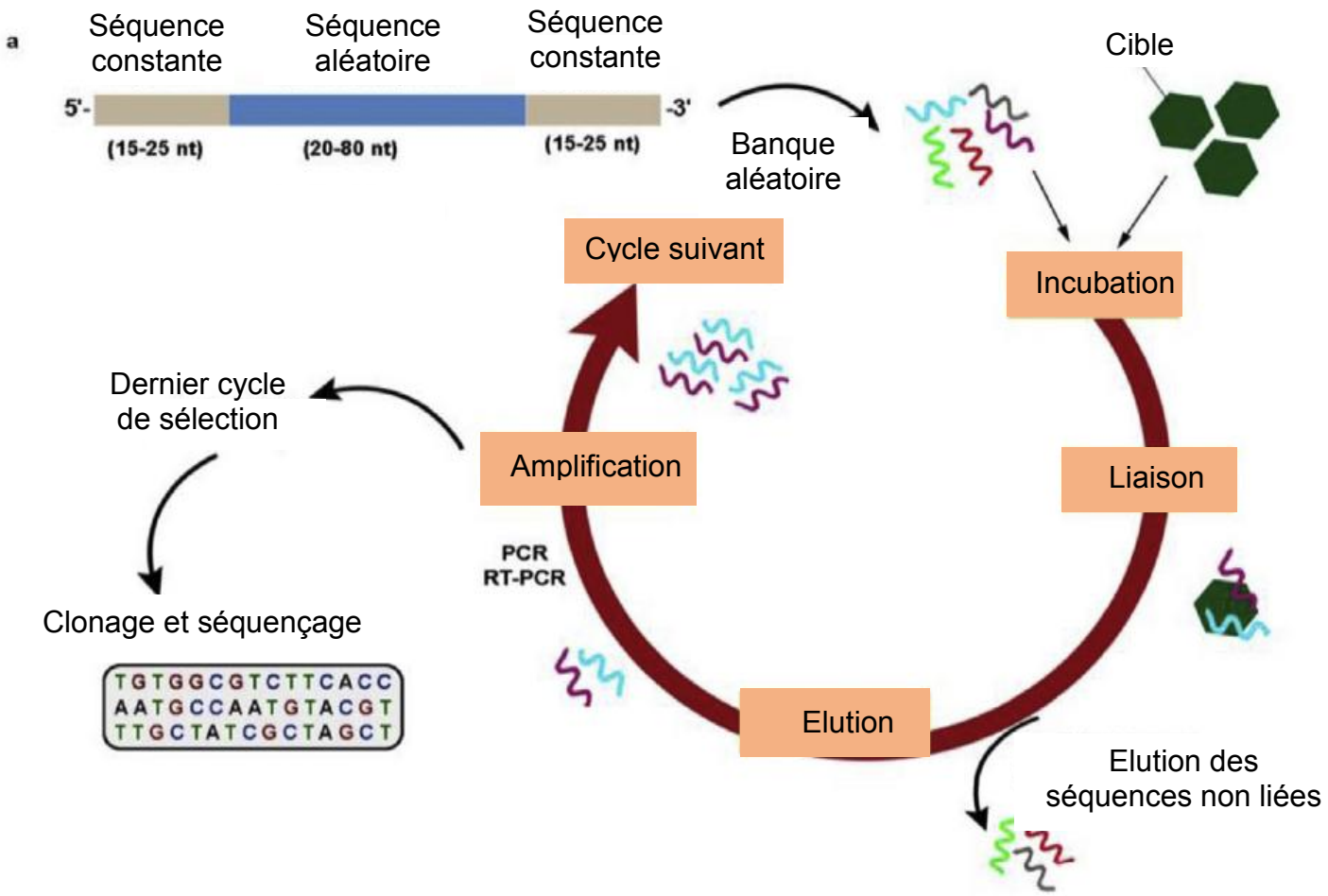
D'ici 2025, la moitié de la population mondiale vivra dans des zones avec un stress hydrique important [OMS, 2018]. Dans certaines zones géographiques comme l'Australie ou encore l'Inde, il devient critique de déterminer des moyens efficaces de traitement de l'eau où cette ressource vient à manquer rapidement. En particulier, la réutilisation des eaux usées à des fins d'irrigation est une perspective très étudiée aux vues des tendances actuelles en matière de consommation d'eau [Scott *et al,* 2004]. Dans ces conditions, la surveillance des virus infectieux dans l'eau devra se réaliser rapidement et de manière fiable [Sano *et al*, 2016]. A la lumière de la résistance de certains virus contre les traitements d'épuration et de potabilisation de l'eau, il paraît urgent de développer des techniques permettant de détecter les virus les plus résistants pour s'assurer de l'efficacité du traitement pour pouvoir prévenir des catastrophes sanitaires. Les nouvelles méthodes de détection de virus dans l'eau se doivent donc d'être efficaces et faciles d'utilisation dans le cadre d'évaluation de contamination sur le terrain ou encore dans le cadre de diagnostic chez les patients présentant les symptômes d'une infection virale. Pour ces raisons, des techniques récentes se sont tournées vers une alternative aux anticorps : les aptamères.

II/ Les aptamères et leurs applications

A] Qu'est-ce qu'un aptamère ?

Introduits dans les années 1990, les aptamères sont de courtes séquences d'acides nucléiques qui sont capables de se lier à de nombreuses cibles : des ions métalliques à des cellules entières en passant par des composés chimiques et biologiques divers. Ces brins d'ARN ou d'ADN simple brin se lient de manière très spécifique et avec une grande affinité à leur cible en raison de leur structure 3D. D'ailleurs, le terme d'aptamère provient des termes ''aptus'' et ''meros'' qui signifient respectivement, 'adapté' et 'partie'. Dans la nature, les aptamères font partie intégrante des « riboswitches ». Ces derniers sont responsables de la modulation de l'expression de certains gènes chez les bactéries. Les domaines aptamères assurent la reconnaissance d'un ligand, provoquant l'activation du « switch » et ainsi, permettant l'expression du gène ou au contraire, diminuant l'expression du gène. De ce fait, de nombreuses applications utilisant le principe de ces domaines aptamères, sont basées sur leur capacité à reconnaître un ligand.

La production des aptamères passe par une étape clé : la « Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment » (ou SELEX). Cette étape permet la sélection et



<u>Figure 4:</u> Représentation schématique de la technique SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) utilisée pour la sélection d'aptamères.

l'amplification d'aptamères pour une cible donnée (Figure 4). Pour ce faire, une banque d'oligonucléotides (des ARN ou des ADN simple brin) est mise en contact avec la cible : certaines séquences d'acides nucléiques vont reconnaître la cible et interagir avec elle, de manière plus ou moins forte. Les oligonucléotides non fixés vont être élués et ceux qui ont reconnu la cible vont être amplifiés par PCR puis à nouveau mis en contact avec la cible. Ce cycle est ainsi répété jusqu'à l'obtention d'oligonucléotides possédant une affinité et une spécificité élevée envers la cible. Les apatmères obtenus sont ensuite clonés et séquencés. De nombreuses variations de la méthode SELEX existent (plus d'une trentaine). Elles permettent de réduire considérablement le temps nécessaire à l'obtention d'aptamères, ou encore de générer des aptamères portant de nouvelles fonctions ou autres modifications [Bayat *et al*, 2018]. Certaines méthodes promettent même de réaliser cette étape *in silico,* prédisant ainsi la structure des aptamères avant leur production [Wang *et al*, 2019].

Les aptamères ont pendant longtemps été éclipsés par les anticorps. Ces deux types de molécules sont très proches dans leurs fonctionnements et ce sont les anticorps qui, historiquement, ce sont imposés comme la référence pour la reconnaissance spécifique de molécules. L'utilisation des aptamères est donc moins répandue que celle des anticorps mais les récents progrès dans la production et l'efficacité des aptamères en font d'excellents remplaçants des anticorps. Les aptamères ont ainsi un réel potentiel dans le milieu biomédical pour la détection de pathogènes, le diagnostic mais aussi dans le traitement de nombreuses maladies [Wang *et al*, 2019].

B] Méthodes actuelles utilisant les aptamères

Même si les anticorps sont largement préférés aux aptamères, ces derniers possèdent cependant plusieurs avantages qui leur permettent de dépasser les anticorps dans certains domaines [Song *et al*, 2012]. Tout d'abord, la production d'aptamères ne se fait pas par l'intermédiaire d'animaux, contrairement à celle des anticorps. Elle est ainsi plus rapide et donne des aptamères dont la qualité est constante. En effet, une fois sélectionné, l'aptamère peut être produit en grande quantité et peut être modifié par réactions chimiques dans le but de lui apporter de nouvelles fonctionnalités ou propriétés. Ces modifications ont pour objectif, par exemple, d'apporter à l'aptamère une plus grande stabilité ou encore une plus grande résistance à l'action des nucléases [Röthlisberger *et al,* 2018]. De plus, les aptamères sont capables de reconnaître une plus grande variété de cibles, notamment des cibles non reconnues par les anticorps tels que

les ions ou de petites molécules. Enfin, une plus faible immunogénicité des aptamères leur ouvre les portes d'une utilisation dans le domaine thérapeutique, en particulier dans le traitement de cancers, où les aptamères sont couplés à l'utilisation de virus [Jing *et al,* 2016]. Les aptamères sont même désormais envisagés pour tester l'efficacité des vaccins à la place des anticorps, puisque moins chers à produire et plus facile à stocker [Trausch *et al,* 2017]. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour déterminer l'efficacité et la sureté des aptamères en thérapeutique.

Outre leur application dans le domaine thérapeutique, les aptamères ont aussi de nombreux usages dans le diagnostic. En effet, de nombreuses techniques ont été mises au point pour la détection d'infections, de pathogènes, et de toutes sortes de substances [Hmila *et al,* 2017 ; Park, 2018]. Ces méthodes de diagnostic se veulent plus rapides, plus simples et plus efficaces que les tests basés sur l'utilisation d'anticorps. Grâce aux caractéristiques des aptamères, certains dispositifs de détection peuvent être réutilisés et offrent des possibilités nouvelles que les anticorps ne peuvent apporter. Labib *et al*, (2012) ont ainsi mis au point une technique utilisant un aptamère très sélectif intégré à un senseur impédimétrique, permettant de différencier les virus infectieux des virus non-infectieux. D'autres auteurs ont conçu des méthodes accessibles sur le lieu de soin (sur le terrain), pour un diagnostic presque immédiat [Fraser *et al,* 2018 ; Lavania *et al,* 2018]. En particulier, Fraser *et al* (2018) ont mis au point un dispositif de détection pour la malaria qui ne demande qu'une goutte de sang et la caméra d'un smartphone pour l'analyse des résultats.

Différents tests et biosenseurs à base d'aptamères ont récemment vu le jour, ils sont classés selon leur méthode de transduction du signal [Majdinasab *et al*, 2018]. On retrouve d'une part les tests optiques et de l'autre les biosenseurs électrochimiques. Les tests optiques sont les plus répandus : ils reposent sur la transformation d'un signal provenant d'un phénomène chimique ou physique en un signal lumineux. Il existe 5 classes de tests optiques. Enfin, les biosenseurs électrochimiques détectent les variations électriques à la surface d'une électrode. Les aptamères sont fixés à la surface de cette électrode et toute interaction avec un ligand aura un effet sur le courant électrique parcourant l'électrode. Ces biosenseurs sont très efficaces et se prêtent très bien à l'utilisation sur le terrain puisqu'ils nécessitent peu de réactifs [Majdinasab *et al,* 2018].

C] Quel avenir pour les aptamères ?

Comparés aux anticorps, les aptamères sont une technologie relativement récente. A ce jour, il existe très peu d'applications commerciales de tests utilisant les aptamères. La plupart des industriels s'étant focalisés sur les anticorps, qui ont représenté un investissement financier important. De plus, les aptamères produits à l'heure actuelle n'ont pas encore atteint leur plein potentiel, ils restent de taille assez limitée comparés aux aptamères que l'on retrouve dans la nature [Mukhopadhyay, 2005]. Surtout, les chercheurs se sont longtemps concentrés sur la détection de molécules qui ne présentaient pas d'intérêt commercial ou clinique [Baird, 2010]. Les aptamères offrent cependant un nombre de possibilités conséquent notamment dans la détection de petites molécules, qui restent jusque-là inaccessibles aux anticorps. C'est le cas notamment des toxines qui doivent être modifiées avant d'être injectées chez l'animal dans le but de produire les anticorps ce qui peut laisser douter de l'efficacité réelle des anticorps ainsi produits. Enfin, les aptamères sont aussi envisagés non plus comme moyens de détection mais comme moyens d'action. En effet, ils pourraient être utilisés pour neutraliser des virus pathogènes ou encore pour éliminer des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques [Bruno, 2015].

Le développement de techniques de détection dites « point of care » représente une opportunité intéressante pour les aptamères dont les caractéristiques permettent leur utilisation, là où les anticorps ne sont pas ou peu utilisables. Ces « point of care » sont des tests permettant de déterminer les actions à entreprendre dans un contexte sanitaire. Ces tests se doivent de fournir des résultats dans les 24h après le début du test. Pour cette raison, les tests colorimétriques sont très appréciés pour leurs résultats parfois visibles à l'œil nu. La présente étude s'est focalisée sur une technique proche de l'ELISA : l'Enzyme-Linked Aptamer Sorbent Assay (ELASA). Cette dernière repose sur l'utilisation d'aptamères sur lesquels peuvent venir se fixer une enzyme capable de transformer un substrat en produit coloré. Le principe de ce genre de technique est très répandu dans des dispositifs de tests immuno-chromatographique (ou Lateral Flow Immunoassay) sous forme de bandelettes.

III/ Le contexte du stage

A] LIST

Mon stage s'est déroulé au LIST (Luxembourg Institute of Science and Technology) au sein du département ERIN (Environmental Research and Innovation) où j'ai intégré l'équipe de Microbiologie Environnementale et Biotechnologie, dirigée par Henry-Michel CAUCHIE. Pendant cette période j'ai été encadré par Leslie OGORZALY. Le LIST a pour objectif d'apporter des solutions innovantes à des besoins clés d'entreprises luxembourgeoises et européennes en tant qu'organisme de recherche et de technologie (RTO). Le LIST fait le lien entre la recherche et la société dans son ensemble et est actif dans les domaines des matériaux, de l'environnement et des technologies de l'information. Le LIST comporte trois départements :

- ERIN (Environment Research and Innovation)
- MRT (Materials Research and Technology)
- ITIS (IT for Innovative Services)

Le LIST est composé de plus de 600 collaborateurs de 40 nationalités différentes. Plus de 75% d'entre eux sont des chercheurs et des spécialistes de l'innovation. Le département ERIN est quant à lui composé de 180 scientifiques et ingénieurs et a pour domaines principaux : les biotechnologies environnementales et industrielles, la gestion des ressources en eau, la quantification des impacts des activités de production et consommation humaines sur l'environnement et les ressources naturelles.

B] Les objectifs du stage

L'objectif majeur de ce stage était de valider une nouvelle méthode de détection des adénovirus humains. Cette méthode est basée sur un test de type ELISA utilisant des aptamères à la place des anticorps. La validation de cette méthode s'est déroulée à travers de nombreux tests permettant d'évaluer les caractéristiques des aptamères sélectionnés précédemment par l'équipe de recherche. Ces derniers ont donc été testés pour leur capacité de liaison, leur affinité, leur sensibilité ainsi que leur spécificité aux adénovirus humains. Le but ici était donc non seulement de reproduire les expériences déjà réalisées qui ont donné lieu au dépôt d'un brevet mais aussi d'explorer certaines hypothèses concernant l'amélioration et l'optimisation de la technique.

Matériel et méthodes

I/ Culture cellulaire - lignées cellulaires A549 et 293A:

A) Entretien des lignées cellulaires

La culture de lignées cellulaires a été réalisée dans le but de produire des stocks d'adénovirus de type 2 à partir de cellules sensibles aux adénovirus. Deux lignées cellulaires ont été utilisées lors de cette étude. La première, la lignée HEK 293A (ATCC® CRL-1573™) a été établie à partir de cellules embryonnaires de rein humain, cette lignée cellulaire est particulièrement utilisée pour sa capacité à produire des HAdV. La seconde est la lignée cellulaire A549 (ATCC® CCL-185™), qui provient de cellules cancéreuses du poumon. Cette lignée convient aussi à la production d'HAdV. Si deux lignées cellulaires distinctes ont été utilisées lors de cette étude, le protocole de culture cellulaire est identique dans les deux cas, seuls les milieux de culture diffèrent. Le milieu de croissance utilisé pour la lignée cellulaire 293A est composé de :

- DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium supplémenté avec du Glutamax (2 mM) et du glucose (4,5 g/L), Life Technologies
- Sérum de veau fœtal (Invitrogen) pour une concentration finale de 5%
- Acides aminés non essentiels en concentration finale 1%.

Le milieu de croissance utilisé pour la lignée cellulaire A549 est composé de :

- Eagle's MEM (Sigma)
- Sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur pour une concentration finale de 10%
- L-glutamine (200 mM) en concentration finale de 1%.

Les cellules conservées à -80°C sont rapidement décongelées et introduites dans une flasque T75cm^3 contenant 20 mL de milieu de culture. Les flasques sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO_2. Les cellules vont alors subir plusieurs « passages » qui consistent à typsiner les cellules pour les décoller du support et pouvoir les diluer dans un milieu frais. Cette étape est répétée au moins trois fois avant de passer à l'infection des cellules par les virus. Ces passages permettent le maintien de la lignée cellulaire. Un passage se déroule comme suit : une fois les cellules à confluence (c'est-à-dire formant un tapis cellulaire) le milieu contenu dans la flasque est retiré et le tapis cellulaire est ensuite lavé à l'aide de 10 mL de PBS. On introduit alors la trypsine (2 mL pour les flasques T75 et 5 mL pour les flasques T175), que l'on va laisser agir pendant 5 minutes à 37°C, celle-ci va dégrader la matrice extracellulaire et permettre le

décrochement les cellules entre elles et du support. Du milieu frais est ajouté, inhibant ainsi la trypsine grâce aux inhibiteurs de protéases contenus dans le FBS. Les cellules sont comptées à l'aide d'un compteur automatique de cellules portatif (Scepter™ 2.0), permettant de calculer le volume de cellules fraîchement trypsinées à transférer en quantité suffisante dans une nouvelle flasque. Ainsi, 1,5 $\times 10^6$ et 3,75 $\times 10^5$ cellules 293A et A549, respectivement, sont introduites dans une flasque T75, contenant 20 mL de milieu frais. La flasque est à nouveau incubée à 37°C pendant 3 à 4 jours.

B) Infection des cellules et récolte des adénovirus humains de type 2 :

Les tapis cellulaires sont infectés avec environ 1 × 10^6 NPPUC/mL d'adénovirus humain de type 2 (ATCC® VR-846™). Les flasques sont ensuite incubées à 37°C pendant 7 à 11 jours. Les premiers effets cytopathogènes du HAdV-2 sont visibles après 4 jours, les cellules s'arrondissent et finissent par perdre leur adhérence au milieu. Après 7 jours, l'infection est complète, la quasi-totalité des cellules se sont détachées du support. Les flasques vont alors subir trois cycle de congélation / décongélation, permettant de libérer les virus contenus dans les cellules. Le milieu de culture est récupéré et centrifugé à 1 200 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est collecté et placé à 4°C. La production d'un témoin a également été effectuée, les cellules sont cultivées dans les mêmes conditions que décrit précédemment mais n'ont pas été infectées avec le virus. Le surnageant est également collecté et constitue le témoin négatif. Ce témoin négatif est donc composé de milieu de culture et de débris cellulaires et est dépourvu de virus.

C) Purification des HAdV-2 :

Deux techniques de purification ont été employées dans le but d'éliminer au maximum la présence de composés du milieu et de débris cellulaires pouvant interférer avec les tests réalisés par la suite..

Tout d'abord, la première technique mise en place repose sur l'utilisation d'un gradient de chlorure de césium. Pour préparer ce gradient, 30,2 mL de solution d'HAdV sont mélangés à 15,42 g de chlorure de césium dans un tube Falcon pour obtenir une densité théorique de 1,34. Un second tube est produit pour l' échantillon témoin. Les préparations sont ensuite réparties dans des tubes spécifiques pour pouvoir procéder à

l'ultracentrifugation (30 000 rpm pendant 22 h à 4°C avec accélération maximale et freinage lent). Deux bandes sont alors visibles : la première en partant du haut contient les capsides virales vides, la seconde contient les virus entiers. A l'aide d'une seringue et d'une aiguille, la seconde bande est collectée. Ces bandes sont absentes dans le tube témoin, mais un prélèvement est réalisé à la même hauteur que la bande prélevée précédemment. Les prélèvements sont ensuite dialysés dans du PBS afin de se débarrasser de toute trace de chlorure de césium.

En parallèle, un kit de purification a aussi été utilisé (Virabind™ Adenovirus Miniprep Kit). Ce kit se compose de colonnes de filtration permettant dans un premier temps de fixer le virus au support filtrant grâce aux propriétés de la capside virale des adénovirus puis d'éluer le virus dans un second temps *via* une solution prévue à cet effet.

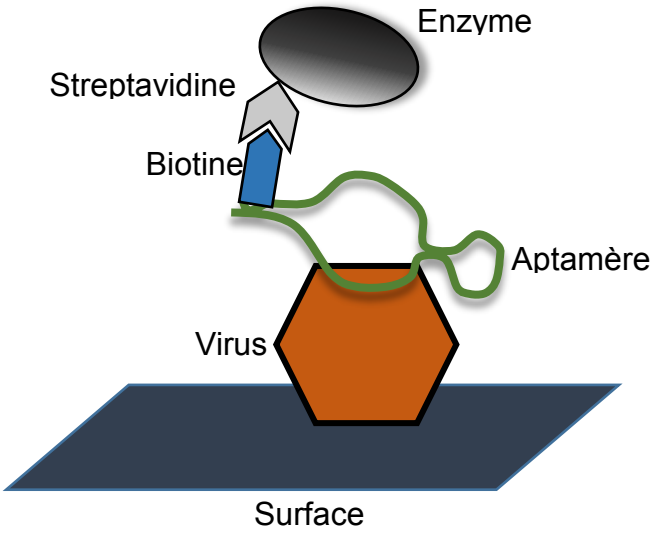
D) Quantification des HAdV-2 :

L'objectif de cette technique est de déterminer la concentration en virus des stocks de virus produits. Pour ce faire, des microplaques de 96 puits sont préparées en inoculant 200 µL de $3{,}3 \times 10^4$ cellules/mL. Des dilutions des stocks viraux ont ensuite été réalisées et appliquées dans les puits. Chaque dilution de virus est répartie sur 40 puits. La détermination de la concentration repose sur l'utilisation de la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP). Après 7 à 15 jours d'incubation, les puits positifs (présentant des effets cytopathogénes) sont dénombrés au microscope. La concentration de virus est déduite à partir des dilutions dont le nombre de puits positifs est différent de 0 et 40.

II/ Aptamères

A) Production des aptamères

Préalablement à cette étude, plus de 80 aptamères ont été sélectionnés par la méthode de SELEX. Cette dernière a été réalisée à l'aide de billes magnétiques sur lesquels ont été fixés des anticorps anti-HAdV. Un pool de séquences d'ADN simple brin a ensuite été mis en contact avec les billes magnétiques. Des aptamères produits après 9, 10 et 11 cycles de SELEX ont été séquencés.



<u>Figure 5:</u> Représentation schématique de la technique de l'ELASA (Enzyme Linked Aptamer Sorbent Assay).

B) Structures et séquences

Une analyse de motifs et de structures secondaires a permis de sélectionner 40 aptamères pouvant potentiellement efficaces dans la reconnaissance des HAdV-2. Chaque aptamère est composé d'une séquence de nucléotides variable, encadrée par 2 séquences constantes correspondant aux amorces de PCR (une amorce sens et une amorce anti-sens)). Dans l'objectif de réaliser un ELASA, une molécule de biotine a été ajoutée du coté 5' ou 3', suivant la structure secondaire de l'aptamère, de manière à ne pas gêner une potentielle zone de reconnaissance des virus sur l'aptamère.

III/ Enzyme Linked Aptamer Sorbent Assay (ELASA):

A) Principe

Cette technique permet de qualifier et de quantifier la reconnaissance d'un ligand par son aptamère. C'est une méthode dérivée de l'ELISA qui repose sur l'utilisation d'un aptamère à la place d'un anticorps. A partir de cette technique, on peut obtenir de nombreux renseignements sur l'aptamère testé. On peut ainsi calculer des constantes de dissociation, tester la spécificité de l'aptamère, ou encore sa sensibilité. Le principe de l'ELASA reste le même, quel que soit l'objectif en vue. En effet, l'ELASA repose sur l'utilisation d'un aptamère biotinylé et d'une protéine (la streptavidine) ayant une forte affinité pour la biotine. Cette protéine est associée à une enzyme (la peroxydase de raifort ou HRP) produisant un produit coloré. La Figure 5 présente le schéma de la technique.

B) Protocole général

Tout d'abord, la microplaque est recouverte de l'antigène (ici d'adénovirus humains de type 2). Pour ce faire, 100 µL de suspension virale, à la concentration choisie, sont introduits dans chaque puits. Les dilutions du virus se font avec du tampon de « coating » (50 mM carbonate de sodium et 50 mM bicarbonate de sodium, pH 9,4). La microplaque est incubée pendant 1 heure à 37°C pour permettre aux virus de se fixer au fond des puits. La suspension virale est ensuite retirée et la plaque est lavée 5 fois à l'aide

de PBS (Gibco). La plaque est ensuite remplie de 300 µL de solution de BSA (Sigma-Aldrich) à 3% (dilué dans du PBS) et est laissée toute la nuit à 4°C. Cette étape permet la saturation des puits pour empêcher plus tard, la fixation d'autres molécules sur les parois des puits qui mènerait à des faux positifs. La plaque est à nouveau lavée 5 fois à l'aide de PBS. Ensuite, 100 µL de l'aptamère sont ajoutés, ce dernier va reconnaitre la cible et s'y fixer. Les aptamères sont dilués dans du tampon de sélection (3 mM $MgCl_2$, 20 mM NaCl dans du PBS + 0,05% Tween 20), nécessaire au maintien du pH et de la force ionique. Les aptamères ont, au préalable, été chauffés à 95°C pendant 10 minutes puis incubés à température ambiante pendant 30 minutes, leur permettant ainsi de prendre leur conformation tridimentionnelle. La plaque est incubée pendant 1 heure à température ambiante avec une légère agitation (100 rpm). Les 100 µL sont retirés et la plaque est lavée 2 fois à l'aide de PBS + Tween (0,05%) et 2 fois avec une solution de BSA 1%. Cent microlitres de streptavidine-HRP (ThermoFisher) sont ajoutés dans chaque puits et la plaque est incubée pendant 30 minutes sous légère agitation (100 rpm), à température ambiante. La plaque est maintenue dans l'obscurité, la HRP étant sensible à la lumière. Les 100 µL sont retirés, la plaque à nouveau lavée avec du PBS puis 100 µL de Tétraméthylbenzidine (TMB, ThermoFisher) sont ajoutés. Le TMB est le substrat de la HRP. Le produit de la réaction est de couleur bleue. La plaque est à nouveau incubée sous légère agitation, dans l'obscurité, pendant 30 minutes. Ensuite, 50 µL d'acide sulfurique 2 M sont introduits dans chaque puits. L'introduction d'H_2SO_4 a pour effet de stopper la réaction enzymatique et change également la couleur bleue du produit obtenu en couleur jaune. La microplaque est ensuite lue grâce à un lecteur de microplaque Spark à une longueur d'onde de 450 nm.

C) Conditions des tests effectués

Une série de tests basés sur le principe de l'ELASA a été réalisée dans le cadre de cette étude. Ces tests avaient pour but de caractériser la liaison des aptamères aux virus, de déterminer la limite de détection de l'ELASA et enfin d'améliorer la sensibilité du test notamment par l'utilisation de différents systèmes de purification des virus, ou encore en utilisant un aptamère modifié avec une molécule fluorescente (6-FAM) permettant de produire un signal différent de l'ELASA présenté précédemment. Les conditions des tests sont résumées dans le Tableau 2.

Nature du test	Concentrations en virus	Concentrations en aptamère
Test de liaison des aptamères	10^7 NPPUC/puits Virus utilisé : HAdV-2	100 nM/puits
Détermination des constantes de dissociation	10^7 NPPUC/puits Virus utilisé: HAdV-2	Gamme de dilutions : de 800 nM à 0,39 nM
Détermination de la limite de détection	Gamme de dilutions de 10^8 à 10^1 NPPUC/mL Virus utilisé: HAdV-2	100 nM/puits (Aptamère 10)
Test de spécificité	_ Adénovirus canin type 1 (ATCC VR-293) : $10^{8,25}$ $TCID_{50}$/0,2 mL _ Adénovirus aviaire type 1 (ATCC VR-432) : $10^{3,75}$ $TCID_{50}$/0,2 mL _ Adénovirus ovin type 5 (ATCC VR-1343) : 10^5 $TCID_{50}$/mL _ Adénovirus humain type 41 (ATCC VR-930) _ Poliovirus (ATCC VR-1003PI/HO) _ Bactériophages (ΦX174, Qβ, MS2)	100 nM/puits (Aptamère 10)
Comparaison des méthodes de purification	10^7 NPPUC/puits pour chaque méthode de détection	100 nM/puits (Aptamère 10 marqué au 6-FAM)

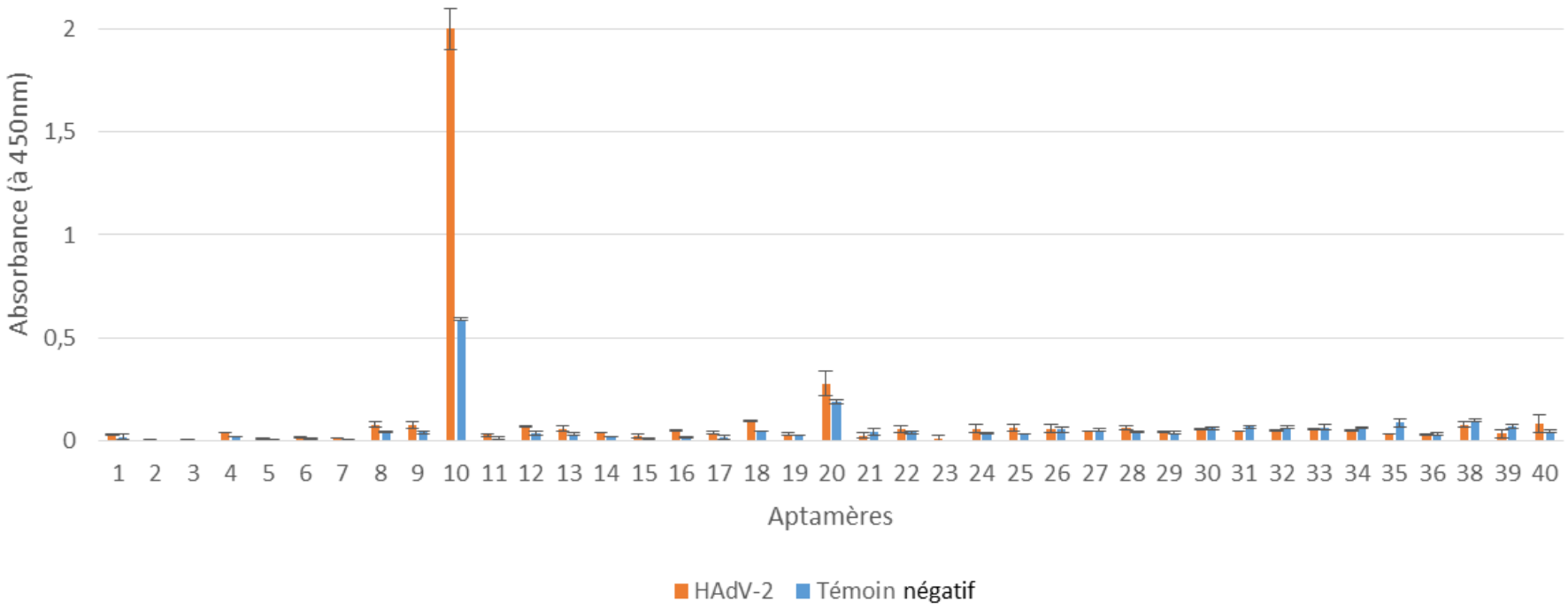
<u>Tableau 2:</u> Conditions expérimentales utilisées pour les différents tests ELASA réalisés lors de cette étude

D) Traitement des données

Sur chaque test ELASA réalisé, des puits ne contenant pas de virus ni d'aptamère ont été disposer sur les microplaques. La valeur moyenne de ces puits représente la valeur du bruit de fond de la technique. Cette valeur est par la suite soustraite aux valeurs obtenues dans les autres puits. De la même manière, la moyenne des valeurs obtenues avec le témoin (surnageant de culture cellulaire sans virus) a été soustraite aux valeurs obtenues avec le virus. Ceci permet de représenter la valeur réelle du signal observé. Des moyennes et des déviations standards ont été calculées et des tests statistiques, sur la base d'un test ANOVA à un facteur, ont été réalisés à partir de ces résultats pour chaque ELASA.

Lors de l'étude des constantes de dissociation, les courbes d'affinité ont été tracées à partir des résultats à l'aide du logiciel SigmaPlot. Ce logiciel permet de lisser la courbe et ainsi, d'obtenir des valeurs de constante d'affinité pour chaque aptamère. L'équation de la courbe d'affinité est : $y = \frac{Bmax \times x}{Kd + x}$ avec $Bmax$ la capacité maximale de liaison, Kd la constante de dissociation et x la valeur de l'absorbance. Chaque point sur la courbe correspond à la moyenne de 3 réplicats.

Résultats



<u>Figure 6:</u> Fixation des aptamères sélectionnés au virus HAdV-2 purifié (ClCs) et au témoin négatif. Les expériences ont été réalisées en triplicats.

I/ Caractérisation des aptamères et du témoin négatif

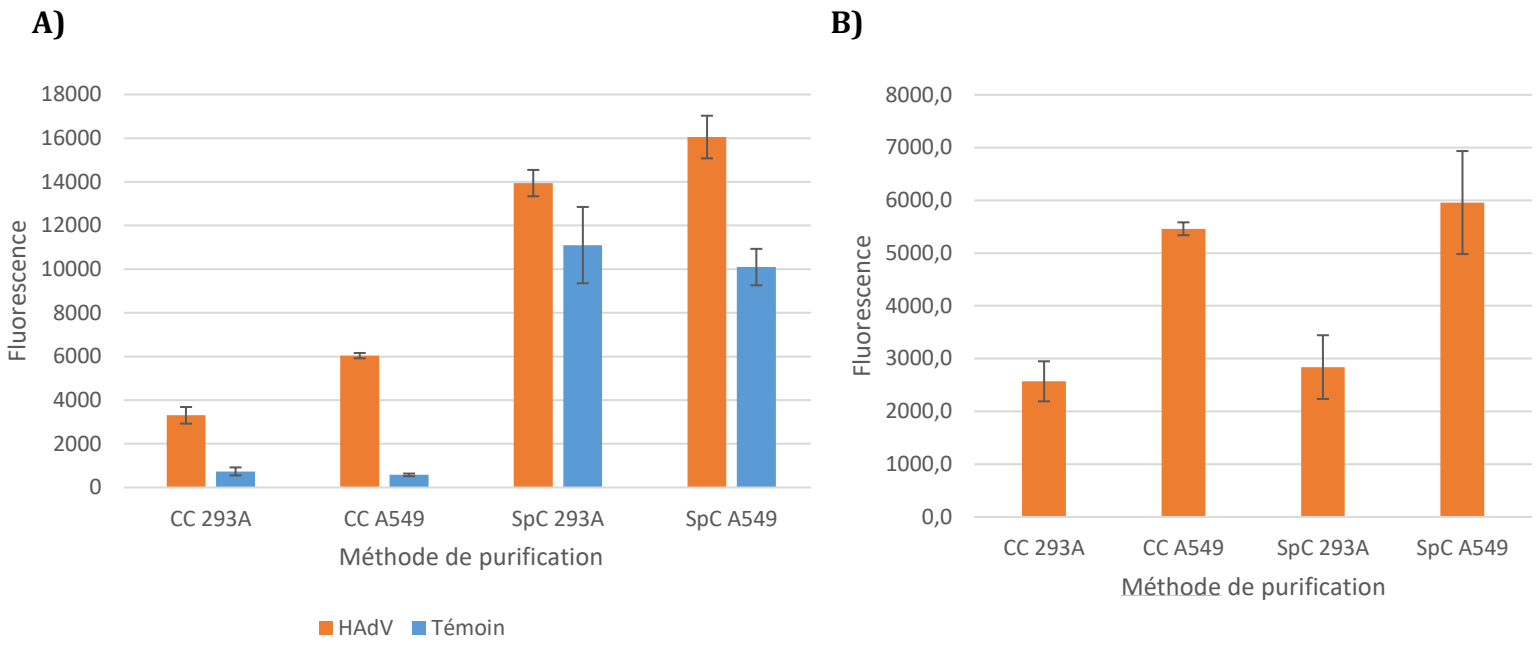
A) Caractérisation des aptamères candidats

Un ELASA direct a été réalisé avec les 40 aptamères sélectionnés. L'objectif de cette expérience était d'évaluer la capacité de liaison au virus de chaque aptamère candidat. Cela permettrait par la suite de sélectionner ceux produisant le signal le plus fort pour procéder à des tests plus approfondis. La Figure 6 présente les résultats, chaque valeur correspond à la moyenne de 3 réplicats. Les aptamères ont été testés contre deux cibles : le virus HAdV-2 et le témoin négatif, purifiés à l'aide de la méthode du chlorure de césium, provenant tous deux de la lignée cellulaire HEK-293A (désignés par CC293A). Le contenu exact du témoin reste méconnu, cependant, des tests ont été effectués pour s'assurer de la spécificité des aptamères pour le virus et non pour un des constituant du milieu de culture.

Il est important de noter qu'un signal est observé avec le témoin. Ce signal est plus important que le signal du bruit de fond et correspond à une reconnaissance, spécifique ou non, par l'aptamère d'un composé du témoin. De ces 40 aptamères, seuls trois ont montré une sensibilité plus importante pour le virus que les autres : ce sont les aptamères 10, 18 et 20. L'aptamère 10 est celui qui obtient le signal le plus fort avec une DO de 2 avec le virus. Même si les aptamères ont tous été sélectionnés lors de l'étape de SELEX contre l'HAdV-2, certains semblent montrer une affinité plus importante que d'autres. C'est le cas notamment avec l'aptamère 10, qui présente un signal près de 15 fois supérieur à l'aptamère 20. La plupart des autres aptamères produisent un signal très faible, surtout une fois comparé au témoin. Ces derniers représentent peu d'intérêt dans la poursuite des tests de cette étude. Ainsi, seuls les meilleurs candidats lors de cette étape ont été conservés pour les tests suivants, c'est-à-dire les aptamères 10, 18 et 20.

B) Caractérisation du témoin négatif

Lors de la caractérisation des aptamères par la méthode de l'ELASA, un signal a pu être observé lors du contact du témoin négatif et des différents aptamères. Ainsi, les aptamères semblent reconnaitre et se fixer à un composant du témoin, produisant un signal, qui reste cependant plus faible que celui obtenu lors du contact avec le virus. De ce fait, lors de cette



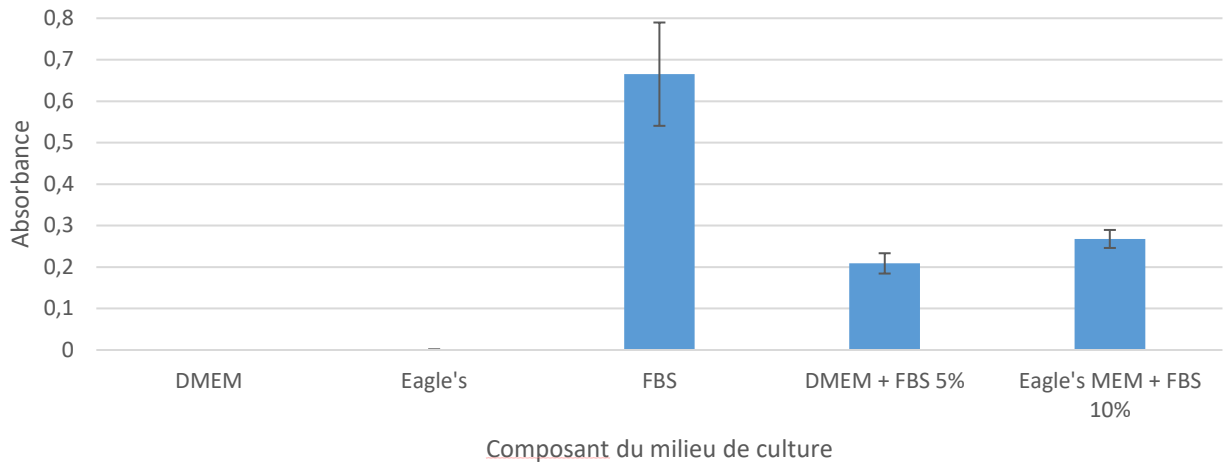
<u>Figure 7:</u> Impact de la méthode de purification et de la lignée cellulaire utilisée pour la production de virus sur la fixation de l'aptamère 10 au virus HAdV-2 et au témoin négatif. Les expériences ont été réalisées en triplicats. (A) Résultats obtenus avec le virus ainsi que le témoin négatif, (B) Résultats obtenus avec le virus dont la valeur des témoins négatifs respectifs a été soustraite. CC : chlorure de cesium, SpC : spin colonne

étude, une attention particulière a été placée dans la recherche de la raison de l'obtention de ce signal avec le témoin.

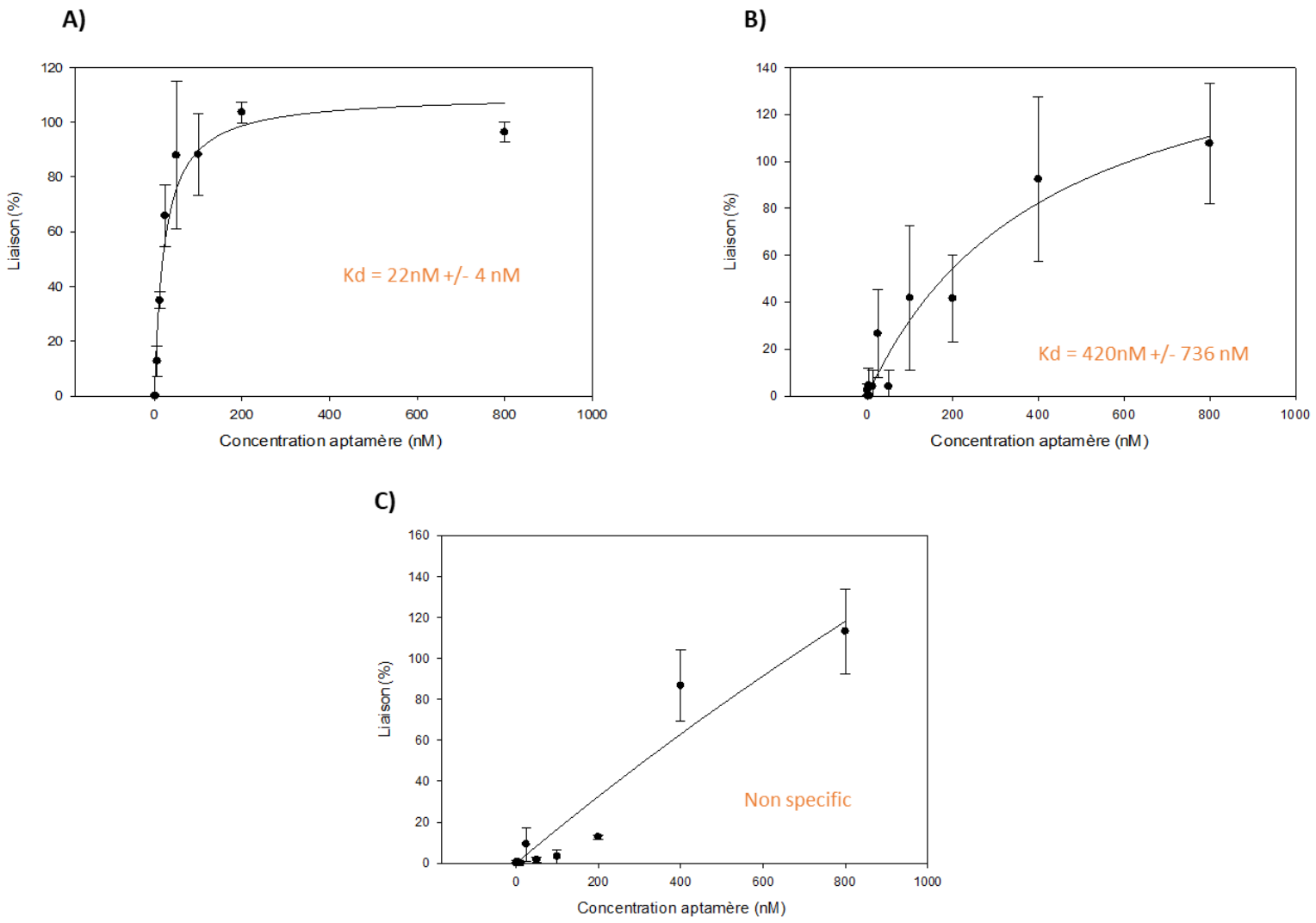
Ce signal pourrait provenir de la reconnaissance d'un fragment cellulaire ou encore d'un composé du milieu qui n'auraient pas été éliminés lors de la purification du stock d'HAdV. C'est sur cette hypothèse qu'en premier lieu, plusieurs techniques de purification du virus ont été déployées afin de réduire voire de supprimer la présence du composant reconnu dans le témoin. L'ensemble des stocks produits ont donc été testés afin de déterminer si une technique purification est plus efficace pour éliminer le signal obtenu avec le témoin. La Figure 7 présente les résultats obtenus. Il est important de noter qu'ici, l'aptamère utilisé en tant que molécule signal est l'aptamère 10 modifié avec une molécule fluorescente : 6-FAM. L'objectif de cette technique était de déterminer si une méthode de purification permettait de réduire le signal du témoin négatif et si la fluorescence permettait une meilleure sensibilité de la méthode.

La purification à l'aide des colonnes de centrifugation semble fonctionner correctement. En effet, la quantification des stocks obtenus avec les deux techniques de purification donne des titres en virus sensiblement proches (données les valeurs) entre ce qui indique un taux de perte faible. Cependant, la technique ne permet pas de supprimer le signal du témoin. Au contraire, le signal du témoin est beaucoup plus fort avec cette méthode (environ le double du signal obtenu par la méthode du chlorure de césium). Néanmoins, cette augmentation du signal du témoin est compensée par une même augmentation du signal avec le virus. Ainsi, une fois le signal du témoin soustrait au signal du virus, on obtient des résultats très similaires entre les deux méthodes de purification (Figure 7B). En effet, pour une même lignée cellulaire, les résultats ne sont pas significativement différents entre les deux méthodes de purification (nom du test à ajouter, $p>0,05$).

La technique la plus efficace pour réduire le signal lié au témoin semble être celle de la purification à l'aide du chlorure de césium sur la lignée cellulaire A549, c'est dans ces conditions que le signal du témoin est le plus faible et le signal du virus est le plus fort. En effet, la valeur obtenue en fluorescence avec le virus pour CCA549 représente de manière significative (p value supérieure à 0,05) le double de cette obtenue pour CC293A (5461 pour CCA549 contre 2569 pour CC293A).



<u>Figure 8:</u> Fixation de l' aptamère 10 aux composants des milieux de culture cellulaire. Les expériences ont été réalisées en triplicats.



<u>Figure 9:</u> Courbes de dissociation des aptamères 10 (A), 18 (B) et 20(C) avec le virus HAdV-2 purifié (CsCl). Les expériences ont été réalisées en triplicats. Kd : constante de dissociation.

Dans un effort de déterminer quel composant du témoin est reconnu par les aptamères, le témoin négatif a été décomposé dans les limites des composants connus présents dans le témoin. Ainsi, ont été mis en contact direct avec l'aptamère 10 : DMEM, Eagle's MEM, et FBS (ThermoFisher). Les résultats sont présentés dans la Figure 8. Il est clairement visible sur la Figure 8 que le FBS est le responsable du signal obtenu avec le témoin négatif, avec une valeur de DO d'environ 0,65 dans le cas du FBS non dilué.

II/ Constantes de dissociation :

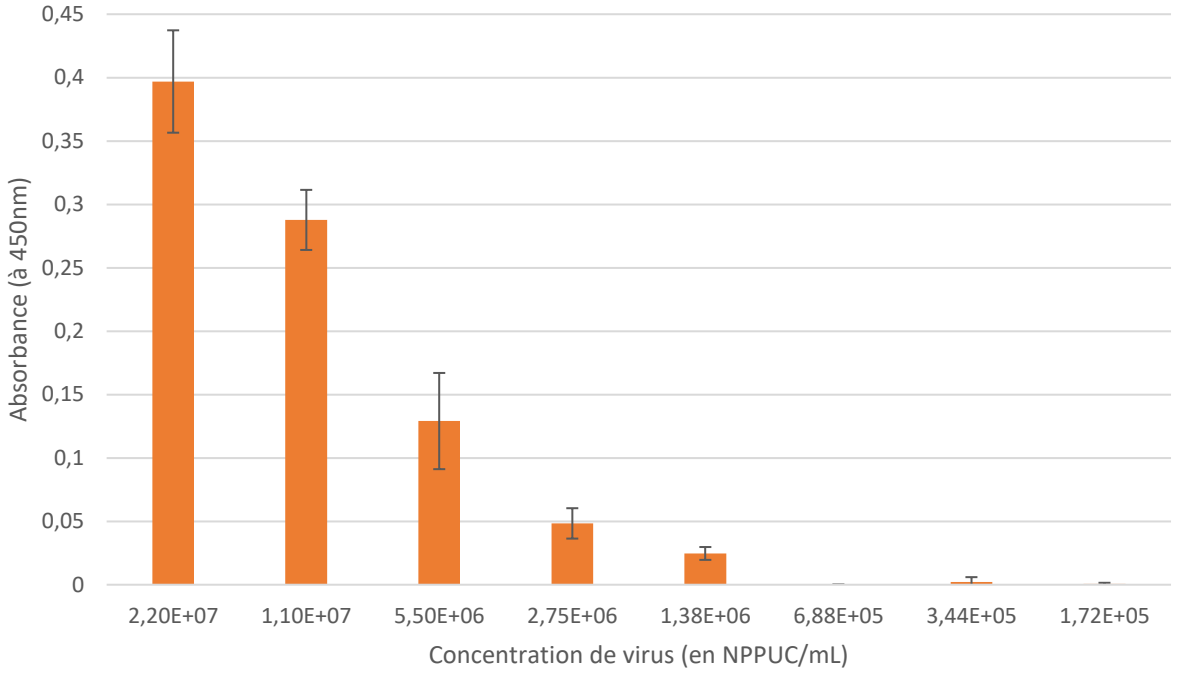
Les trois aptamères présentant des résultats intéressants ont été testés pour déterminer leur affinité aux HadV-2. Pour ce faire, les aptamères 10, 18 et 20 ont été mis en contact avec une concentration fixe de virus dans une microplaque de 96 puits.

Malgré le potentiel intéressant des aptamères 10, 18 et 20, seuls les résultats de l'aptamère 10 ont permis d'obtenir une courbe d'affinité et des valeurs de constante d'affinité (Kd) satisfaisantes. La Figure 9 présente les courbes d'affinité obtenues. Il est clair sur les Figures 9B et 9C que les aptamères, respectivement 18 et 20, ne se lient pas au virus avec une grande affinité. Leurs valeurs de Kd ne peuvent pas être prises en compte dû à une très grande variabilité des valeurs. Les résultats obtenus ne permettent pas de tracer une courbe d'affinité fiable. L'aptamère 10 quant à lui, semble posséder une grande affinité pour le virus : la valeur de Kd obtenue est de 22 nM (+/- 4 nM). Cette valeur de Kd confirme bien la capacité de l'aptamère 10 à se fixer au virus.

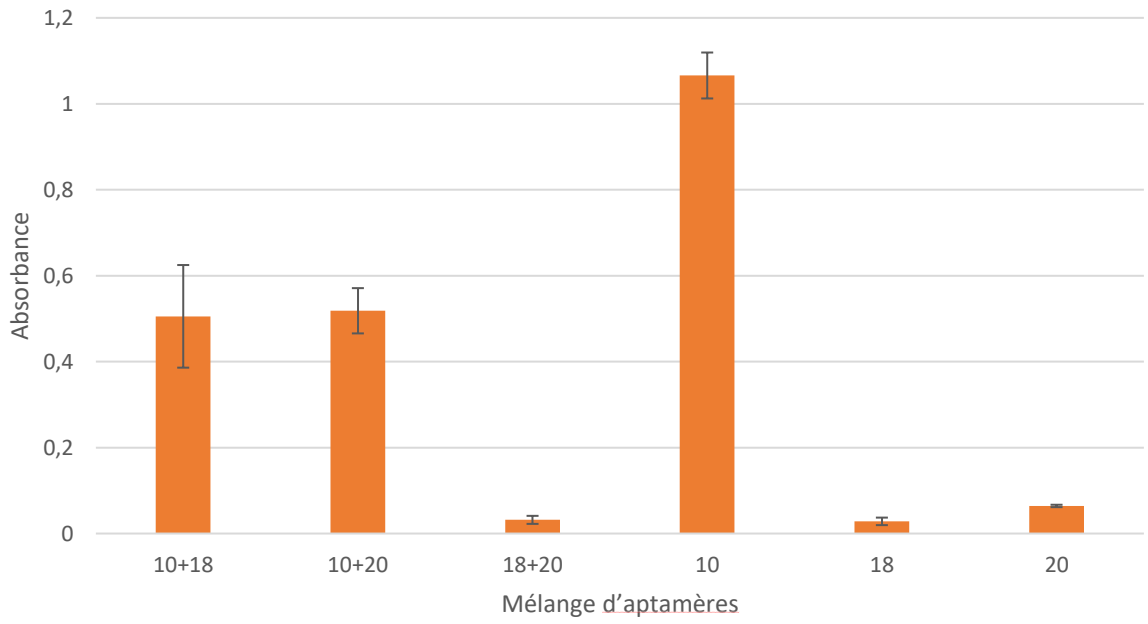
III/ Sensibilité de détection :

A) ELASA

L'aptamère 10 a été testé de manière plus approfondie pour notamment pouvoir déterminer la limite de détection du test ELASA. La Figure 10 présente les résultats obtenus lors d'unesérie de dilutions de virus, chaque valeur correspond à la moyenne de 3 réplicats. Dans le cadre de cet ELASA, la limite de détection se situe autour de $1,38 \times 10^6$ NPPUC/mL pour une DO d'environ 0,02. En dessous de $1,38 \times 10^6$NPPUC/mL, le signal produit par l'aptamère 10 devient trop faible et n'est plus détectable en utilisant cette méthode d'ELASA



<u>Figure 10:</u> Sensibilité de la méthode d' ELASA directe utilisant l'aptamère 10 pour la détection de l'HAdV-2. Les expériences ont été réalisées en triplicats.



<u>Figure 11:</u> Impact de l'utilisation de mélanges d'aptamères (10, 18 et 20) sur l'efficacité de détection de l'HAdV-2. Les expériences ont été réalisées en triplicats.

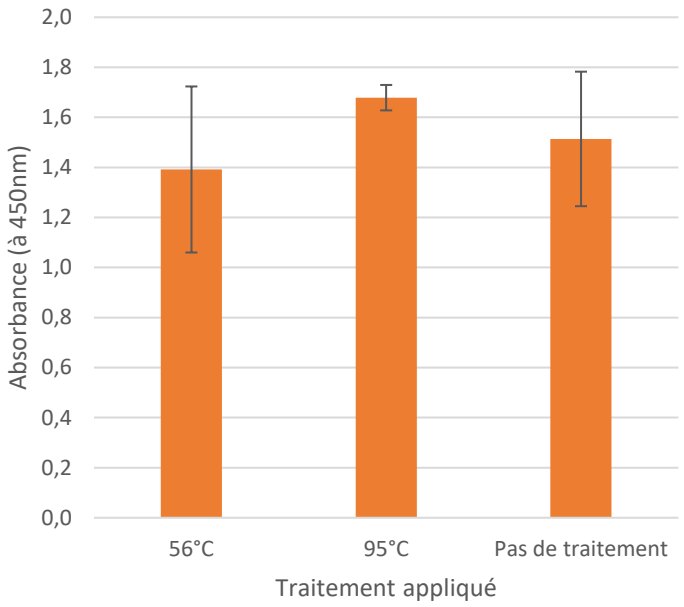
direct. Une DO de 0,02 semble être le minimum de signal pour pouvoir différencier un signal positif d'un signal négatif. Cette valeur obtenue lors de ce test, résulte d'un calcul permettant de retirer le signal du bruit de fond ainsi que le signal du témoin. La valeur brute de DO du signal pour le virus à $1,38 \times 10^6$ NPPUC/mL est de 0,16 ce qui est une valeur supérieure au bruit de fond qui est de 0,11 (données non présentées).

Dans l'objectif d'abaisser la limite de détection et d'augmenter la sensibilité de la technique, un ELASA sandwich a été réalisé. Pour ce faire, une paire aptamère-anticorps et une paire d'aptamères ont été testées. Un anticorps anti-HAdV dirigé contre l'hexon de la capside virale ainsi que l'aptamère 10 ont été utilisés comme molécules capture reconnaissant le virus HAdV-2. La molécule de détection est restée l'aptamère 10 dans les deux cas. Les résultats obtenus ont montré une grande variabilité (données non présentées). Dans l'ensemble, les deux ELASA sandwich présentaient un signal faible et très variables. Cette technique n'a donc pas permis d'apporter une plus grande sensibilité au test. En effet, les différents tests réalisés avec l'ELASA sandwich n'ont pas permis d'abaisser la limite de détection, et d'une manière globale, n'ont pas permis non plus de reproduire les résultats obtenus par ELASA direct. Ces résultats peuvent s'expliquer en partie par l'utilisation de microplaques ne possédant pas de système permettant l'orientation des molécules allant se déposer au fond des puits, le revêtement des puits se faisant alors de manière aléatoire.

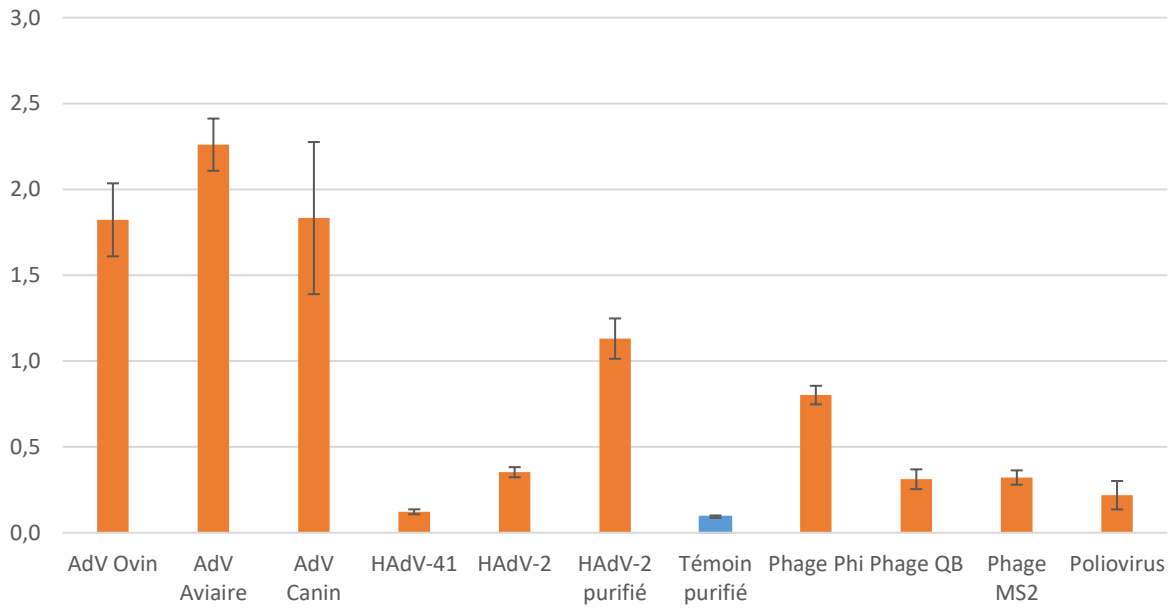
Par ailleurs, une autre condition pour la technique ELASA a été testée. Des mélanges d'aptamères ont été effectués à partir des trois aptamères intéressants : les aptamères 10, 18 et 20. Les conditions du test sont identiques aux conditions du test ELASA sur les 40 aptamères candidats. Les résultats sont présentés dans la Figure 11. D'une manière générale, aucune des combinaisons d'aptamères ne permet d'améliorer le signal obtenu. Par exemple, le mélange aptamère 10 et 18 présente un signal deux fois plus petit que le signal obtenu par l'aptamère 10 seul (DO=0,50 pour mélange aptamères 10+18 contre DO=1.05 pour aptamère 10 seul).

B) Virus infectieux

Par ailleurs, l'aptamère 10 a aussi été évalué pour sa capacité à différencier les virus infectieux des virus non infectieux. Les HAdV-2 ont subis deux traitements thermiques : un traitement de 10 minutes à 96°C et un autre de 56°C pendant 30 minutes. Ces deux



<u>Figure 12:</u> Impact de différents traitements thermiques (56°C - 30 min, ou 95°C - 5 min) sur la détection de l'HAdV-2 par l'aptamère 10. Les expériences ont été réalisées en triplicats.



<u>Figure 13:</u> Fixation de l'aptamère 10 sur différents virus (HAdV-2, HAdV-41, CAdV-1, FAdV-1, OAdV-5, Sab-1, ΦX174, Qβ, MS2). Les expériences ont été réalisées en triplicats.

traitements inactivent les virus et dans le cas du traitement à 96°C, est capable de rompre l'intégrité de la capside virale.
On peut voir sur la Figure 12 que l'aptamère 10 produit un signal similaire dans les trois cas. On obtient ainsi une DO de 1,4 pour le traitement à 56°C, 1,7 pour le traitement à 96°C et 1,5 en absence de traitement thermique. Ces résultats ne sont pas significativement différents ($p>0,05$).

C) Spécificité

En plus de sa capacité à se lier aux HAdV-2, l'aptamère 10 a aussi été testé pour sa capacité à reconnaitre d'autres HAdV mais pas d'autres virus. L'objectif de ce test est de vérifier que l'aptamère 10 est spécifique des HAdV. De ce fait, un ELASA direct a été réalisé en mettant en contact l'aptamère 10 avec des adénovirus animaux : adénovirus canin de type 1 (CAV-1), adénovirus aviaire de type 1 (FAV-1) et adénovirus ovin type 5 (OAV-5) ainsi que d'autres virus tels que adénovirus humain type 41, poliovirus Sab1 et des bactériophages (ΦX174, Qβ, MS2).
L'ensemble des résultats est présenté dans la Figure 13. Un fort signal peut être observé pour les adénovirus animaux (DO entre 1,8 et 2,2). En revanche, un signal beaucoup plus faible est obtenu avec l'HAdV-2 non purifié ainsi qu'avec les HAdV-41. Un signal relativement élevé est aussi obtenu avec les bactériophages. Le signal obtenu avec le poliovirus est de l'ordre de celui obtenu avec le témoin purifié (DO de 0,1 pour le témoin et de 0,2 pour le poliovirus contre 1,3 pour HAdV-2 purifié).

Discussion

Le développement de méthodes de détection de pathogènes est actuellement un enjeu majeur dans le cadre de l'évaluation des risques sanitaires liés à l'utilisation de l'eau. La crise climatique et les techniques de productions alimentaires intensives, notamment, appliquent une pression de plus en plus importante sur la consommation et sur le contrôle de l'eau. Ainsi, les systèmes de traitement des eaux usées et des eaux de boisson se doivent de se doter de méthodes performantes et rapides dans la détection de nombreux pathogènes tels que les bactéries et les virus. L'objectif de la présente étude était de caractériser une série d'aptamères sélectionnés contre l'adénovirus humain sérotype 2 pour leurs capacités de liaison, leurs affinités ainsi que leurs spécificités aux adénovirus humains. *In fine*, les aptamères les plus performants pourront être utilisés pour développer un nouveau test de détection applicable aux échantillons environnementaux.

Ainsi, 40 aptamères ont été caractérisés pour leur capacité à se lier aux HAdV-2. Ces aptamères ont été produits par la méthode SELEX où une banque de séquences d'acides nucléiques a été mise en contact avec des d'HAdV-2. En ont résulté, plus de 80 séquences d'ADN simple brin pouvant potentiellement reconnaitre des HAdV. Parmi ces séquences, 40 aptamères ont été synthétisés et testés. La première étape a été de caractériser la liaison avec les HAdV-2 et de comparer les différents aptamères. Les résultats ont montré qu'un aptamère en particulier (l'aptamère 10) était nettement plus efficace que les autres. Selon les cibles (protéines, virus ou cellules entières) et les méthodes de SELEX, plusieurs candidats intéressants peuvent être trouvés, par exemple Bruno *et al*, 2012 ont réussi à produire, pour chacun de trois types d'arbovirus différents, une dizaine d'aptamères se liant avec une grande affinité. D'ailleurs, les auteurs ont aussi opté pour la technique d'ELASA pour tester l'affinité de leurs aptamères. Si seul l'aptamère 10 s'est révélé être efficace, cela peut s'expliquer en partie par la particularité de la méthode SELEX. En effet, un grand nombre de séquences se liant à la cible est produit à partir de la banque d'ADN de départ. Sur des centaines de séquences, seule une partie est clonée puis synthétisée, laissant de nombreuses autres séquences potentiellement intéressantes de côté. De ce fait, les 40 aptamères testés ne représentent qu'une très faible fraction des séquences obtenues par le SELEX avec comme cible, lesHAdV-2. Il est possible d'envisager continuer la sélection des aptamères en procédant à de nouveaux cycles de SELEX à partir du pool d'aptamères obtenu précédemment. En

augmentant le nombre de cycles, les chances d'obtenir des aptamères plus spécifiques augmentent aussi. Par ailleurs, la mise en place d'étapes de contre-SELEX permettrait d'éliminer de nombreuses séquences peu spécifiques. Cette étape de contre-SELEX consiste, dans le cas de cette étude, à mettre en contact les séquences d'ADN avec d'autres virus que les HAdV-2 (comme des adénovirus animaux par exemple) permettant ainsi d'écarter toutes les séquences se fixant aux autres virus. Ce genre d'étapes permettrait ici d'affiner les séquences obtenues en excluant celles reconnaissant d'autres virus que le virus cible. Il serait également très intéressant de faire un contre-SELEX avec le FBS pour éliminer le signal du témoin négatif.

L'un des principaux points critiques de la méthode SELEX provient de la cible utilisée pour sélectionner les séquences d'acides nucléiques : la sélection reposant sur la reconnaissance et la fixation de ces dernières sur la cible. Cependant, de nombreuses autres molécules sont utilisées lors de la technique (lors des différentes élutions et rinçages ou encore dans les tampons). Ainsi, il est probable qu'un nombre relativement important de séquences soient sélectionnées non pas grâce à leur reconnaissance avec la cible mais grâce à l'interaction des séquences avec ces autres molécules. Il serait donc intéressant de pratiquer des contre-SELEX, c'est-à-dire de placer les séquences en présence de molécules différentes de la cible, telles que le FBS par exemple. De plus, ces étapes de Contre-SELEX pourraient constituer un moyen d'augmenter la spécificité des séquences en utilisant des molécules proches de la cible : par exemple dans le cas de cette étude, des adénovirus animaux. Cela permettrait ainsi d'éliminer les séquences reconnaissant ces virus, ne conservant ainsi que celles ayant une grande affinité pour les adénovirus humains. Cela pourrait aussi permettre d'éliminer les séquences reconnaissant le FBS et ainsi, supprimer le signal obtenu avec le témoin.

Il est aussi possible d'envisager l'application de modifications sur les aptamères déjà obtenus ou sur de nouvelles séquences qui seront par la suite traitées par la technique du SELEX. Ces modifications peuvent prendre la forme de groupements fixés sur les séquences d'acides nucléiques, leur procurant ainsi des fonctionnalités semblables aux protéines (interactions hydrophobes améliorées, forte affinité…). Ces séquences sont appelées SOMAmer (pour Slow Off-rate Modified Aptamers) et sont capables de montrer une très forte affinité pour leur cible. Un très grand nombre de

modifications différentes peuvent être appliquées aux aptamères, cependant, il est parfois possible que ces séquences modifiées se comportent différemment *in vivo* ce qui peut poser problème lors de l'analyse d'échantillons environnementaux ou en thérapeutique [Kalra *et al*, 2018].

Néanmoins, l'aptamère 10 représente un candidat très prometteur, de par sa capacité à se lier aux HAdV-2 avec une forte affinité. La production d'aptamères à travers la méthode SELEX permet d'obtenir des molécules avec une affinité et une sensibilité très importante : certains aptamères possèdent une affinité avec leur molécule cible de l'ordre du picomolaire. Dans cette étude, l'aptamère 10 présente une affinité aux HAdV-2 autour de 22 nM et se place dans l'ordre des valeurs généralement observées dans la littérature pour les constantes de dissociation des aptamères [Park, 2018 ; Shiratori *et al,* 2014].

La présente étude a suivi une approche similaire de celle de Escudero-Abarca *et al*, 2014. Grâce à leur technique de SELEX, les auteurs sont parvenus à produire 4 aptamères intéressants mais ont par la suite, focalisé leurs tests sur un seul aptamère. Ce dernier est capable de se lier à une large diversité de norovirus humains avec une très grande affinité (proche de celle des anticorps commerciaux). Les auteurs ont ainsi pu tester leur aptamère en le mettant en contact avec des échantillons provenant de patients atteints lors d'épidémies de norovirus, confirmant ainsi l'importante de leur aptamère. De la même manière, dans la présente étude, l'aptamère 10 a démontré sa forte affinité aux HAdV-2 à travers la technique d'ELASA. Cependant, il semble que malgré la capacité de liaison de l'aptamère 10, la limite de détection de la technique soit très élevée. En effet, la limite de détection obtenue se trouve être de l'ordre de 10^6 NPPUC/mL pour obtenir un signal suffisant. Cependant, la concentration en virus des eaux environnementales est beaucoup plus basse que la limite de détection de l'ELASA et se situe entre 10^3 NPPUC/L pour les eaux de récréations et 10^6 NPPUC/L pour les eaux usées [Fong *et al*, 2010]. Même si les échantillons environnementaux doivent en général passer par une étape de concentration des virus, les concentrations environnementales ne permettent pas une utilisation de la technique telle qu'elle se trouve actuellement. De plus, avec les limitations de la technique, il n'est pas possible de déterminer la spécificité de l'aptamère même si l'on peut supposer que l'aptamère 10 est spécifique aux adénovirus humains et ne devrait pas être en mesure de reconnaitre les adénovirus de type ovin, aviaire ou

canin. En effet, les résultats obtenus souffrent d'un biais important apporté par les adénovirus animaux : ces derniers sont dilués dans du milieu de culture (contenant parfois jusqu'à 20% de FBS) et ne sont pas en concentration suffisante pour permettre la dilution du milieu de culture. De ce fait, un signal important a été observé avec les adénovirus animaux, très probablement dû au FBS présent dans le milieu de culture.
D'une manière générale, l'interaction entre l'aptamère 10 et le virus reste assez méconnue. Du fait de l'utilisation d'un virus entier lors de la méthode SELEX, le site de fixation de la séquence sur le virus est inconnu. Une meilleure caractérisation du site de fixation pourrait permettre de mieux comprendre l'existence des signaux obtenus en présence de FBS qui pourraient à termes, être supprimés ou au moins réduits au minimum.

Au vu de la faible sensibilité de la technique actuellement utilisé (ELASA), l'analyse d'échantillons environnementaux semble difficile en particulier lorsque l'on considère la faible concentration de virus dans les eaux environnementales ce qui nécessite une étape de concentration, rendant ainsi la technique de l'ELASA moins efficace en augmentant temps de réponse du test ainsi que le nombre de manipulations à effectuer sur les échantillons. La technique d'ELASA n'étant pas optimisée pour l'étude d'échantillons environnementaux, un nouveau et meilleur design d'expérimentation doit être étudié afin d'obtenir une technique plus sensible aux HAdV-2. Il existe de nombreux biosenseurs différents utilisant les aptamères. Une technique intéressante se base sur la mesure du changement d'un courant électrique provoqué par les réactions ayant lieu à la surface d'une électrode où sont disposés des aptamères. Ce genre de test électrochimique utilise peu de réactifs ou d'instrumentation et représente un candidat intéressant pour la mise au point de tests à réaliser sur le terrain [Majdinasab *et al,* 2018]. En particulier si la sensibilité de la technique est supérieure aux techniques colorimétrique.

Cependant, la forte affinité de l'aptamère 10 envers les adénovirus ainsi que l'efficacité de la technique actuelle, notamment le temps nécessaire pour obtenir les résultats qui est inférieur à 24h, représentent deux caractéristiques intéressantes dans un contexte clinique. En effet, la concentration en virus dans les selles des patients atteints par des adénovirus est bien supérieure à celles rencontrées dans l'environnement. Il est ainsi possible d'atteindre des concentrations de l'ordre de 10^6 à

10^8 particules/mL [Echavarria, 2008]. Ces concentrations se situent dans les limites de détection de la technique qui pourrait servir d'outil de diagnostic très intéressant. De par leurs diverses manifestations cliniques, le diagnostic d'une infection viral aux adénovirus est parfois difficile à poser. Dans le cas des patients immunodéprimés, ce genre d'outil de diagnostic pourrait se révéler vital pour permettre un traitement approprié et appliqué le plus tôt possible.

D'une manière générale, les aptamères constituent un élément de plus en plus présent dans les systèmes de diagnostic « Point of Care ». Ces systèmes de diagnostic se doivent d'être rapides et simples d'utilisation pour permettre une utilisation sur le terrain : en général dans des conditions où l'accès à des laboratoires n'est pas disponible. C'est le cas notamment des tests immuno-chromatographiques (ou LFA pour Lateral Flow Assay) qui se présentent sous la forme de bandes ou de dispositifs à usage unique. Leur utilisation nomade en fait d'eux des stratégies de premières intentions pour la surveillance et l'étude d'épidémies. De nombreux dispositifs utilisant les aptamères ont été mis au point et reposent sur des tests colorimétriques, la fluorescence ou encore des nanoparticules pour analyser les échantillons [Dhiman *et al*, 2017]. Un bon exemple de POC basé sur l'utilisation d'aptamères est le dispositif mis au point par Kiilerich-Petersen *et al* (2013), utilisant le changement d'impédance provoqué par la fixation de virus influenza A (H1N1) sur les aptamères disposés sur une membrane. Les résultats sont obtenus en moins de 15 minutes et la technique peut être adaptée à de nombreux autres virus si des aptamères spécifiques à ces derniers sont trouvés.

La production et l'utilisation des aptamères reste un processus relativement nouveau, demandant encore de nombreux ajustements et avancées dans le domaine pour espérer totalement remplacer les anticorps. Néanmoins, le potentiel des aptamères ne se limitent pas à imiter et remplacer les anticorps mais à dépasser les limites actuelles des techniques de détection, de thérapeutique et de diagnostic reposant sur ces derniers. Les aptamères représentent des candidats de choix pour de nouvelles applications telles que pour la production de vaccins, de traitement contre des infections virales ou bactériennes ou encore pour l'élimination de toxines [Bruno, 2015]. La présente étude a su dégager un candidat intéressant parmi les 40 aptamères testés, cependant la technique d'ELASA testée n'est pas optimale pour tirer le maximum du potentiel de l'aptamère 10. D'autres

tests et expérimentations sont nécessaires pour définir une technique sensible, efficace et rapide. Au vu des résultats obtenus dans cette étude, l'intérêt et le potentiel des aptamères ne fait aucun doute.

Pour conclure, les aptamères représentent des éléments uniques de détection grâce à leur grande diversité de cibles, leur stabilité mais aussi leur forte affinité. Avec une demande croissante en biosenseurs dans de nombreux domaines (santé, surveillance environnementale, sécurité), les aptamères se révèlent être une alternative viable aux tests immunologiques actuellement utilisés. Toutefois, les aptamères font face à la forte concurrence des anticorps, implantés depuis plus longtemps dans les laboratoires et ainsi considérés comme standard pour de nombreux tests. Néanmoins, la possibilité d'apporter des modifications aux aptamères pour les rendre plus efficaces, leur moyen de production ainsi que les applications nouvelles se basant sur les aptamères sont autant d'arguments qui permettront aux aptamères de petit à petit remplacer et à terme dépasser les capacités des anticorps. La difficulté pour le moment étant de sélectionner et caractériser des aptamères à forte affinité pour leur cible et ensuite de développer des appareils et tests de détection fiables et commercialisables reposant sur l'utilisation de ces aptamères.

Références

Abadian, P. N., N. Yildirim, A. Z. Gu, and E. D. Goluch. "Spri-Based Adenovirus Detection Using a Surrogate Antibody Method." *Biosens Bioelectron* 74 (2015): 808-14.

Baird, G. S. "Where Are All the Aptamers?". *Am J Clin Pathol* 134, no. 4 (2010): 529-31.

Bayat, P., R. Nosrati, M. Alibolandi, H. Rafatpanah, K. Abnous, M. Khedri, and M. Ramezani. "Selex Methods on the Road to Protein Targeting with Nucleic Acid Aptamers." *Biochimie* 154 (2018): 132-55.

Bruno, J. G. "Predicting the Uncertain Future of Aptamer-Based Diagnostics and Therapeutics." *Molecules* 20, no. 4 (2015): 6866-87.

Echavarria, M. "Adenoviruses in Immunocompromised Hosts." *Clin Microbiol Rev* 21, no. 4 (2008): 704-15.

Escudero-Abarca, B. I., S. H. Suh, M. D. Moore, H. P. Dwivedi, and L. A. Jaykus. "Selection, Characterization and Application of Nucleic Acid Aptamers for the Capture and Detection of Human Norovirus Strains." *PLoS One* 9, no. 9 (2014): e106805.

Fong, T. T., M. S. Phanikumar, I. Xagoraraki, and J. B. Rose. "Quantitative Detection of Human Adenoviruses in Wastewater and Combined Sewer Overflows Influencing a Michigan River." *Appl Environ Microbiol* 76, no. 3 (2010): 715-23.

Fongaro, G., M. A. Nascimento, C. Rigotto, G. Ritterbusch, A. D. da Silva, P. A. Esteves, and C. R. Barardi. "Evaluation and Molecular Characterization of Human Adenovirus in Drinking Water Supplies: Viral Integrity and Viability Assays." *Virol J* 10 (2013): 166.

Fraisse, A., C. Coudray-Meunier, S. Martin-Latil, C. Hennechart-Collette, S. Delannoy, P. Fach, and S. Perelle. "Digital Rt-Pcr Method for Hepatitis a Virus and Norovirus Quantification in Soft Berries." *Int J Food Microbiol* 243 (2017): 36-45.

Fraser, L. A., A. B. Kinghorn, R. M. Dirkzwager, S. Liang, Y. W. Cheung, B. Lim, S. C. Shiu*, et al.* "A Portable Microfluidic Aptamer-Tethered Enzyme Capture (Aptec) Biosensor for Malaria Diagnosis." *Biosens Bioelectron* 100 (2018): 591-96.

Fu, Y., Z. Tang, Z. Ye, S. Mo, X. Tian, K. Ni, L. Ren, E. Liu, and N. Zang. "Human Adenovirus Type 7 Infection Causes a More Severe Disease Than Type 3." *BMC Infect Dis* 19, no. 1 (2019): 36.

Gall, A. M., B. J. Marinas, Y. Lu, and J. L. Shisler. "Waterborne Viruses: A Barrier to Safe Drinking Water." *PLoS Pathog* 11, no. 6 (2015): e1004867.

Gerba, C. P., D. M. Gramos, and N. Nwachuku. "Comparative Inactivation of Enteroviruses and Adenovirus 2 by Uv Light." *Appl Environ Microbiol* 68, no. 10 (2002): 5167-9.

Ghebremedhin, B. "Human Adenovirus: Viral Pathogen with Increasing Importance." *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 4, no. 1 (2014): 26-33.

Haramoto, E., M. Kitajima, A. Hata, J. R. Torrey, Y. Masago, D. Sano, and H. Katayama. "A Review on Recent Progress in the Detection Methods and Prevalence of Human Enteric Viruses in Water." *Water Res* 135 (2018): 168-86.

Hmila, I., M. Wongphatcharachai, N. Laamiri, R. Aouini, B. Marnissi, M. Arbi, S. Sreevatsan, and A. Ghram. "A Novel Method for Detection of H9n2 Influenza Viruses by an Aptamer-Real Time-Pcr." *J Virol Methods* 243 (2017): 83-91.

Jiang, S. C. "Human Adenoviruses in Water: Occurrence and Health Implications: A Critical Review." *Environ Sci Technol* 40, no. 23 (2006): 7132-40.

Jing, P., S. Cao, S. Xiao, X. Zhang, S. Ke, F. Ke, X. Yu*, et al.* "Enhanced Growth Inhibition of Prostate Cancer in Vitro and in Vivo by a Recombinant Adenovirus-Mediated Dual-Aptamer Modified Drug Delivery System." *Cancer Lett* 383, no. 2 (2016): 230-42.

Kajon, A. E., X. Lu, D. D. Erdman, J. Louie, D. Schnurr, K. S. George, M. P. Koopmans, T. Allibhai, and D. Metzgar. "Molecular Epidemiology and Brief History of Emerging Adenovirus 14-Associated Respiratory Disease in the United States." *J Infect Dis* 202, no. 1 (2010): 93-103.

Kalra, P., A. Dhiman, W. C. Cho, J. G. Bruno, and T. K. Sharma. "Simple Methods and Rational Design for Enhancing Aptamer Sensitivity and Specificity." *Front Mol Biosci* 5 (2018): 41.

Kiilerich-Pedersen, K., J. Dapra, S. Cherre, and N. Rozlosnik. "High Sensitivity Point-of-Care Device for Direct Virus Diagnostics." *Biosens Bioelectron* 49 (2013): 374-9.

Koren, M. A., J. C. Arnold, M. P. Fairchok, T. Lalani, P. J. Danaher, C. M. Schofield, M. Rajnik*, et al.* "Type-Specific Clinical Characteristics of Adenovirus-Associated Influenza-Like Illness at Five Us Military Medical Centers, 2009-2014." *Influenza Other Respir Viruses* 10, no. 5 (2016): 414-20.

Labib, M., A. S. Zamay, D. Muharemagic, A. V. Chechik, J. C. Bell, and M. V. Berezovski. "Aptamer-Based Viability Impedimetric Sensor for Viruses." *Anal Chem* 84, no. 4 (2012): 1813-6.

Lamson, D. M., A. Kajon, M. Shudt, G. Girouard, and K. St George. "Detection and Genetic Characterization of Adenovirus Type 14 Strain in Students with Influenza-Like Illness, New York, USA, 2014-2015." *Emerg Infect Dis* 23, no. 7 (2017): 1194-97.

Lavania, S., R. Das, A. Dhiman, V. P. Myneedu, A. Verma, N. Singh, T. K. Sharma, and J. S. Tyagi. "Aptamer-Based Tb Antigen Tests for the Rapid Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Potential Utility in Screening for Tuberculosis." *ACS Infect Dis* 4, no. 12 (2018): 1718-26.

Lee, S. H., and S. J. Kim. "Detection of Infectious Enteroviruses and Adenoviruses in Tap Water in Urban Areas in Korea." *Water Res* 36, no. 1 (2002): 248-56.

Li, J., X. Lu, Y. Sun, C. Lin, F. Li, Y. Yang, Z. Liang*, et al.* "A Swimming Pool-Associated Outbreak of Pharyngoconjunctival Fever Caused by Human Adenovirus Type 4 in Beijing, China." *Int J Infect Dis* 75 (2018): 89-91.

Mukhopadhyay, R. "Aptamers are ready for the spotlight" *American chemical society* (2005) : 115A-118A.

Majdinasab, M., Hayat, A., Marty, J.L. "Aptamer-based assays and aptasensors for detection of pathogenic bacteria in food samples." *Anal Chem 107,* (2018): 60-77.

Ogorzaly, L., I. Bertrand, M. Paris, A. Maul, and C. Gantzer. "Occurrence, Survival, and Persistence of Human Adenoviruses and F-Specific RNA Phages in Raw Groundwater." *Appl Environ Microbiol* 76, no. 24 (2010): 8019-25.

Ogorzaly, L., H. M. Cauchie, C. Penny, A. Perrin, C. Gantzer, and I. Bertrand. "Two-Day Detection of Infectious Enteric and Non-Enteric Adenoviruses by Improved Icc-Qpcr." *Appl Microbiol Biotechnol* 97, no. 9 (2013): 4159-66.

Ogorzaly, L., A. Tissier, I. Bertrand, A. Maul, and C. Gantzer. "Relationship between F-Specific Rna Phage Genogroups, Faecal Pollution Indicators and Human Adenoviruses in River Water." *Water Res* 43, no. 5 (2009): 1257-64.

Park, K. S. "Nucleic Acid Aptamer-Based Methods for Diagnosis of Infections." *Biosens Bioelectron* 102 (2018): 179-88.

Rames, E., A. Roiko, H. Stratton, and J. Macdonald. "Technical Aspects of Using Human Adenovirus as a Viral Water Quality Indicator." *Water Res* 96 (2016): 308-26.

Rothlisberger, P., and M. Hollenstein. "Aptamer Chemistry." *Adv Drug Deliv Rev* 134 (2018): 3-21.

Ryu, H., J. L. Cashdollar, G. S. Fout, K. A. Schrantz, and S. Hayes. "Applicability of Integrated Cell Culture Quantitative Pcr (Icc-Qpcr) for the Detection of Infectious Adenovirus Type 2 in Uv Disinfection Studies." *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 50, no. 8 (2015): 777-87.

Sano, D., M. Amarasiri, A. Hata, T. Watanabe, and H. Katayama. "Risk Management of Viral Infectious Diseases in Wastewater Reclamation and Reuse: Review." *Environ Int* 91 (2016): 220-9.

Sarantis, H., G. Johnson, M. Brown, M. Petric, and R. Tellier. "Comprehensive Detection and Serotyping of Human Adenoviruses by Pcr and Sequencing." *J Clin Microbiol* 42, no. 9 (2004): 3963-9.

Scott A. C., I. Faruqui N. and L. Raschid-Sally. "Wastewater use in irrigated agriculture: management challenges in developing countries". 163-172. 10.1079/9780851998237.0000, (2004)

Shiratori, I., J. Akitomi, D. A. Boltz, K. Horii, M. Furuichi, and I. Waga. "Selection of DNA Aptamers That Bind to Influenza a Viruses with High Affinity and Broad Subtype Specificity." *Biochem Biophys Res Commun* 443, no. 1 (2014): 37-41.

Sinclair, R. G., E. L. Jones, and C. P. Gerba. "Viruses in Recreational Water-Borne Disease Outbreaks: A Review." *J Appl Microbiol* 107, no. 6 (2009): 1769-80.

Song, K. M., S. Lee, and C. Ban. "Aptamers and Their Biological Applications." *Sensors (Basel)* 12, no. 1 (2012): 612-31.

Trausch, J. J., M. Shank-Retzlaff, and T. Verch. "Replacing Antibodies with Modified DNA Aptamers in Vaccine Potency Assays." *Vaccine* 35, no. 41 (2017): 5495-502.

Van Heerden, J., M. M. Ehlers, W. B. Van Zyl, and W. O. Grabow. "Incidence of Adenoviruses in Raw and Treated Water." *Water Res* 37, no. 15 (2003): 3704-8.

Verani, M., I. Federigi, G. Donzelli, L. Cioni, and A. Carducci. "Human Adenoviruses as Waterborne Index Pathogens and Their Use for Quantitative Microbial Risk Assessment." *Sci Total Environ* 651, no. Pt 1 (2019): 1469-75.

Wang, T., C. Chen, L. M. Larcher, R. A. Barrero, and R. N. Veedu. "Three Decades of Nucleic Acid Aptamer Technologies: Lessons Learned, Progress and Opportunities on Aptamer Development." *Biotechnol Adv* 37, no. 1 (2019): 28-50.

Wyer, M. D., A. P. Wyn-Jones, D. Kay, H. K. Au-Yeung, R. Girones, J. Lopez-Pila, A. M. de Roda Husman, S. Rutjes, and O. Schneider. "Relationships between Human Adenoviruses and Faecal Indicator Organisms in European Recreational Waters." *Water Res* 46, no. 13 (2012): 4130-41.

Xie, L., B. Zhang, J. Zhou, H. Huang, S. Zeng, Q. Liu, Z. Xie*, et al.* "Human Adenovirus Load in Respiratory Tract Secretions Are Predictors for Disease Severity in Children with Human Adenovirus Pneumonia." *Virol J* 15, no. 1 (2018): 123.

Résumé:

De nombreuses données épidémiologiques montrent une implication importante des virus dans les causes de maladies liées au contact ou à la consommation d'eau. Les adénovirus humains de par leur résistance ainsi que leur prévalence dans l'environnement en font un problème majeur de santé publique ainsi que de potentiels indicateurs de qualité de l'eau. Plusieurs méthodes de détection des virus existent à ce jour, mais leurs limites sont nombreuses. Le récent développement des aptamères devrait permettre de mettre au point de nouvelles techniques de détection des virus. L'objectif de la présente étude était de caractériser une série d'aptamères sélectionnés contre l'adénovirus humain sérotype 2 pour leurs capacités de liaison, leurs affinités ainsi que leurs spécificités aux adénovirus humains. Pour ce faire, une technique proche de l'ELISA a été utilisée mais en remplaçant les anticorps par des aptamères.

Mots-clés: Adénovirus, aptamères, détection, environnement

Abstract:

Many epidemiological data indicate a significant involvement of viruses in the causes of waterborne illnesses (contact or consumption). Human adenoviruses, due to their persistence and prevalence in the environment make them a major public health concern and potential water quality indicators. Several viral detection methods exist to date, but their limitations are numerous. The recent advancements in the aptamer technology should make it possible to develop new techniques for virus detection. The objective of this study was to characterise a series of aptamers selected against human adenovirus serotype 2 for their binding capacities, affinities as well as specificities towards human adenoviruses. To do this, a technique similar to ELISA was used, but replacing antibodies with aptamers.

Key words: Adenoviruses, aptamers, detection, environment