

## **Les aptamères : des ligands et des catalyseurs oligonucléotidiques obtenus par sélection in vitro**

**Jean-Jacques Toulmé  
Richard Giegé**

La biologie moléculaire moderne permet d'explorer la diversité combinatoire des acides nucléiques et de créer et sélectionner de nouvelles molécules d'ADN ou d'ARN aptes à reconnaître des ligands ou à catalyser des réactions chimiques ou biochimiques : on les nomme aptamères. Les deux étapes-clés du protocole de création des aptamères sont la conception de la banque d'oligonucléotides, d'une part, et l'efficacité de la méthode de sélection, d'autre part. La sélection peut être dirigée contre des cibles d'intérêt pharmacologique pour inhiber une fonction protéique ou une activité enzymatique. Ces pistes sont explorées pour interférer, par exemple, avec l'accomplissement de cycles viraux, les processus de coagulation... Les recherches sur les aptamères en sont à leur début, les applications à venir nombreuses.

### ADRESSES

J.J. Toulmé : *directeur de recherche à l'Inserm*, Inserm U. 386, IFR Pathologies infectieuses, Université Victor-Segalen, Bordeaux 2, 146, rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. R. Giegé : *directeur de recherche au Cnrs*, UPR 9002, Structures des macromolécules biologiques et mécanismes de reconnaissance, Institut de biologie moléculaire et cellulaire du Cnrs, 15, rue René-Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France.

**L**a complexité du vivant est le reflet de celle des molécules qui en assurent le fonctionnement et du jeu des reconnaissances auxquelles elles donnent lieu. Cette complexité se trouve en premier lieu dans les protéines et les acides nucléiques. Un calcul simple montre que la combinatoire dans ces macromolécules est immense. Ainsi, pour une séquence polypeptidique de taille moyenne, formée de l'enchaînement de

200 acides aminés choisis parmi les 20 acides aminés naturels,  $20^{200}$  séquences ( $10^{260}$ ) sont théoriquement possibles; de même, pour un acide nucléique long de 200 nucléotides, on peut engendrer  $4^{200}$  séquences différentes ( $10^{120}$ ) à partir des 4 unités constituant l'ADN ou l'ARN. Comparés à d'autres grandeurs, tel le nombre d'Avogadro ( $N = 6,021 \cdot 10^{23}$ ) ou une estimation du nombre d'atomes dans l'univers ( $10^{130}$ ), ces nombres sont tellement

immenses qu'il est clair que seulement une fraction infiniment petite de l'ensemble des séquences possibles est utilisée par les organismes vivants actuels. On peut donc prévoir *a priori* que des séquences autres que les séquences naturelles peuvent conduire à des structures macromoléculaires fonctionnelles. Par ailleurs, on peut penser que de nombreuses macromolécules ne sont pas apparues tout simplement parce que l'évolution n'a eu ni le temps, ni le besoin de les engendrer, et aussi parce que celles retenues ont évolué vers les structures actuelles à partir d'un nombre restreint d'ancêtres plus simples. Ainsi on peut aisément comprendre la singularité des macromolécules actuelles, car la Nature n'a pas exploré toute la combinatoire de l'ensemble des possibles.

La biologie moléculaire permet aujourd'hui d'explorer cette combinatoire et de créer de nouvelles structures macromoléculaires possédant, telles les structures naturelles, des propriétés de reconnaissance ou d'activité catalytique [1-3]; elle permet aussi de mimer *in vitro* ou *in vivo* des processus évolutifs, ou encore de modifier les propriétés de structures existantes. Les méthodes combinatoires utilisées pour créer de nouvelles molécules se posent, aujourd'hui, en alternative à la conception rationnelle: à la synthèse d'un composé défini, guidée par la modélisation moléculaire et l'analyse structurale, répond la synthèse aléatoire de familles complexes. La mise en œuvre de méthodes de sélection de molécules actives au sein de ces familles remplace les ajustements préétablis entre groupements fonctionnels de la cible et du ligand. Face au faible taux de succès rencontré dans la conception «rationnelle» de molécules douées des propriétés attendues, il est en effet tentant de multiplier les candidats et de les analyser, simultanément ou en parallèle. Les approches combinatoires se trouvent confrontées à l'identification des quelques molécules actives au sein de populations comportant plusieurs milliers, voire des millions de candidats sans intérêt. Ce problème est relativement facile à résoudre lorsque les familles sont composées d'acides nucléiques. En effet, dans ce cas la molécule active porte, codée par

l'enchaînement des nucléotides constitutifs, l'information nécessaire à sa multiplication à l'identique par des polymérases d'ADN ou d'ARN. Cela justifie en grande partie l'intérêt grandissant porté aux approches de sélection dans des bibliothèques de séquences oligonucléotidiques. Nous discuterons ici les problèmes conceptuels et méthodologiques posés par ces stratégies et présenterons quelques exemples de séquences sélectionnées.

## Concepts et méthodologies

On peut s'interroger sur l'intérêt présenté par des séquences oligonucléotidiques en tant que ligands de cibles variées. En fait, l'enchaînement des nucléotides les uns aux autres (la séquence primaire) dicte les repliements de la chaîne dans l'espace (les structures secondaire et tertiaire). Une bibliothèque d'oligonucléotides se présentera comme une population de formes, offrant une multitude de groupements susceptibles de s'associer à un partenaire *via* des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogène ou des interactions hydrophobes.

On peut penser que dans une population suffisamment riche se trouvera une séquence – une forme – adaptée à la reconnaissance de la cible choisie. La coexistence, dans la même entité moléculaire, de la forme et de la séquence permet, par alternance d'une étape de sélection (liée à la forme) et d'amplification (liée à la séquence), d'extraire de la famille, à l'issue d'un processus d'évolution moléculaire, le(s) candidat(s) doué(s) des propriétés attendues. De fait, depuis six ou sept ans, ces techniques connues sous des noms divers (SELEX – pour *systematic evolution of ligands by exponential enrichment* – [1, 3], génétique *in vitro* [4], évolution moléculaire dirigée [5]), ont conduit à l'isolement de motifs d'ADN ou d'ARN possédant des propriétés prédéfinies.

Des méthodologies analogues (*phage display* [2] et synthèse combinatoire de peptides [6]), dont nous ne parlerons pas ici, s'appliquent au monde des protéines.

Les acides nucléiques sélectionnés pour leur aptitude à reconnaître d'autres molécules ont été appelés

« aptamères » [4]. Leur obtention repose en premier lieu sur la constitution de banques d'oligonucléotides à partir desquelles ils seront isolés, mais aussi sur l'efficacité des techniques de tri des oligonucléotides, ARN ou ADN, selon des critères prédéfinis (interaction avec un ligand, sélection d'un produit de réaction...). Puisque le nombre de molécules qui vont répondre à un critère donné sera petit, il sera nécessaire d'amplifier les quelques molécules retenues.

Le principe de la méthodologie de sélection *in vitro* est schématisé dans la figure 1.

En pratique, un protocole d'identification d'aptamères ARN comporte 5 étapes.

D'abord on prépare une banque ADN constituée d'oligonucléotides dans lesquels une séquence plus ou moins dégénérée est flanquée de régions fixes contenant les signaux nécessaires à sa multiplication par des polymérases (figure 1A).

Ensuite, cette population est transcrite en une bibliothèque d'ARN simple brin par une ARN polymérase. La troisième étape est la sélection proprement dite au cours de laquelle on isole les oligoribonucléotides répondant au critère de tri.

Ces ARN sont séparés des molécules ne satisfaisant pas ce critère, avant d'être convertis en ADN simple brin par transcription inverse au cours de la quatrième étape.

Les séquences sélectionnées sont enfin amplifiées par PCR (*polymerase chain reaction*). Au terme de cette cinquième étape, on obtient une bibliothèque enrichie en candidats intéressants.

Le taux d'enrichissement sera fonction des conditions de sélection qui sont déterminantes pour l'évolution de la population.

Cette succession d'étapes de sélection et d'amplification sera répétée afin d'obtenir une bibliothèque restreinte contenant des séquences aptamères. Les séquences sélectionnées sont alors clonées et séquencées. L'extraction d'aptamères ADN est beaucoup plus simple puisqu'elle ne nécessite pas les conversions ADN-ARN et dispense donc des étapes de transcription et de transcription inverse (figure 1B). Dans ce protocole, les deux étapes-clés sont la conception de la banque et l'efficacité de la méthode de sélection.

## Création de banques

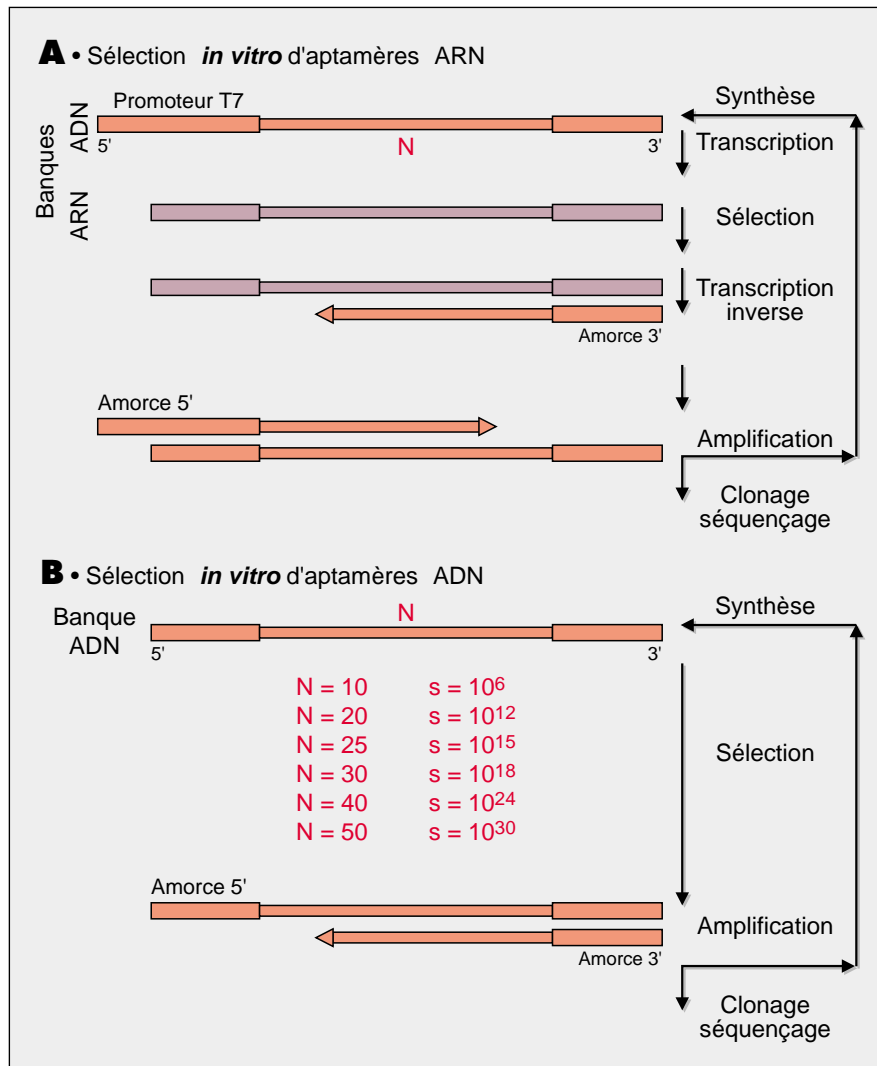


Figure 1. **Stratégie de sélection *in vitro* d'aptamères.** La banque de séquences est constituée d'oligodésoxyribonucléotides synthétiques comportant une région aléatoire de  $N$  nucléotides encadrée par deux motifs fixes. Dans le cas de la sélection de séquences ARN (A), l'un de ces motifs fixes porte un promoteur permettant à une ARN polymérase (celle du bactériophage T7 par exemple) de transcrire les candidats ADN en ARN. Cette population d'oligoribonucléotides est alors soumise à sélection pour la propriété recherchée (affinité, activité catalytique; voir Tableau I pour les techniques utilisées). Les séquences ARN sélectionnées sont ensuite transformées en ADN par une transcriptase inverse qui effectue cette copie à partir d'une amorce ADN complémentaire du motif fixe en 3'. Ces ADN sont alors amplifiés par une étape de polymérisation en chaîne (PCR), généralement à l'aide d'une ADN polymérase thermostable et de deux amorces correspondant aux deux régions fixes en 3' et en 5' (l'amorce en 5' permet de restaurer le promoteur fonctionnel). On réalise ainsi un certain nombre de cycles avant de cloner les séquences sélectionnées. Le séquençage de quelques-uns de ces clones permettra d'identifier les aptamères, de les synthétiser et d'étudier leurs propriétés. La sélection d'aptamères ADN (B) est plus simple puisqu'elle ne comporte pas les étapes d'interconversion d'ADN en ARN et réciproquement. On notera la complexité des bibliothèques engendrées: pour  $N = 10$  positions aléatoires on obtient  $s = 10^6$  séquences différentes et pour  $N = 50$ ,  $s = 10^{30}$ ! Les parties épaisses des séquences (à droite et à gauche) correspondent aux régions fixes, identiques pour tous les candidats; les parties plus fines (au centre) correspondent à la fenêtre variable. L'ARN est représenté en bistre, l'ADN en rouge.

La première question concerne le type d'acide nucléique qui sera utilisé pour constituer la banque. On a vu qu'il est plus facile de mettre en œuvre un protocole de sélection ADN; par ailleurs, on peut penser qu'il sera plus facile de trouver un aptamère ARN pour des protéines spécifiques des ARN et, réciproquement, des aptamères ADN pour des facteurs qui fixent l'ADN. Cependant, l'expérience a montré que l'on peut isoler des séquences ADN qui se fixent à des protéines interagissant naturellement avec l'ARN. D'ailleurs on peut engendrer des aptamères, ADN ou ARN, contre des cibles moléculaires qui ne sont pas connues pour fixer les acides nucléiques. Le choix de la nature chimique de la banque sera donc en premier lieu déterminé par le but dans lequel l'expérience de sélection est conduite. On peut en effet chercher à identifier un motif consensus pour une interaction donnée, ou modifier la spécificité d'un processus connu. Il s'agit là d'expériences d'évolution moléculaire *in vitro* pour lesquelles on dispose d'une séquence initiale présentant des caractéristiques proches de celles recherchées. A l'inverse, on peut rechercher des aptamères pour lesquels il n'existe pas d'équivalent naturel connu. Dans ce cas la liberté de choix est totale.

Tout au plus peut-on être guidé par l'utilisation finale de l'aptamère: utilisation « génétique » (transfection d'une cellule récipiente par une construction ADN adéquate) ou « pharmacologique » (administration de l'oligonucléotide nu ou vectorisé), par exemple. L'objectif à atteindre guide également le choix de la taille de la région aléatoire, de même que le niveau de dégénérescence. Ces deux paramètres déterminent la richesse de la bibliothèque à partir de laquelle sera effectuée la sélection (figure 1B). Pour des raisons expérimentales (synthèse, volume des échantillons à manipuler), la limite supérieure de complexité analysable est de l'ordre de  $10^{15}$  molécules, ce qui correspond à des bibliothèques de séquences comportant 25 positions totalement aléatoires ( $4^{25} = 10^{15}$ ); si davantage de positions sont entièrement dégéné-

rées, l'échantillon ne contiendra pas un exemplaire de chaque molécule possible. Pour des expériences d'évolution moléculaire la connaissance de la séquence modèle peut aider à la détermination de la bibliothèque. Dans les autres cas, il s'agit souvent d'un choix arbitraire.

Les banques, de tailles variables (de moins de  $10^3$  jusqu'à  $10^{15}$  molécules et plus), peuvent être créées à partir de séquences d'ADN correspondant à un domaine (ADN ou ARN) connu [3], mais peuvent également être constituées de longues séquences d'ADN entièrement dégénérées [1]. Si l'objectif est la sélection de structures à fonctions et architectures entièrement nouvelles, il peut être intéressant d'utiliser des banques complètement dégénérées et renfermant un très grand nombre de séquences possibles ( $> 10^{15}$ ). De grandes banques dérivant d'une structure connue sont également envisageables pour des expériences d'évolution moléculaire *in vitro*, où l'on désire modifier progressivement la spécificité d'une fonction au cours de cycles de sélection successifs.

Il y a différentes manières de dégénérer une séquence. Des blocs de nucléotides peuvent être dégénérés totalement ou partiellement; on peut aussi dégénérer des nucléotides isolés ou des blocs reliés entre eux par des séquences constantes. Des dégénérescences partielles peuvent concerner un grand nombre de positions ( $> 200$  nucléotides) et des variations peuvent être introduites au cours des cycles de sélection. De fait, des variations aléatoires sont souvent produites par suite d'erreurs des polymérases lors des cycles d'amplification. Cela constitue un moyen d'élargir, au cours du processus de sélection, l'échantillon des séquences initiales.

En résumé, la création d'une banque repose sur des choix en partie arbitraires de l'expérimentateur, guidé par la question à laquelle il veut apporter une réponse.

### **Stratégies et méthodes de sélection**

Deux grands principes de sélection peuvent être utilisés pour la recherche d'aptamères (Tableau I). D'une part, des méthodes fondées sur

l'affinité de la molécule cible pour l'aptamère et, d'autre part, des méthodes qui sélectionnent le(s) produit(s) oligonucléotidique(s) d'une réaction enzymatique catalysée, soit par des enzymes protéiques, soit par des acides nucléiques catalytiques. La sélection par critères d'association utilise souvent la rétention des complexes aptamère/cible sur filtres lorsque la cible est une protéine [3, 9] ou sur une colonne d'affinité lorsque la cible est une petite molécule [5]. Les oligonucléotides fixés à la cible sont ensuite élués. Cette étape entraîne généralement la contamination de la population d'aptamères par des séquences qui étaient associées au support. On peut également utiliser une méthode électrophorétique dite de retard sur gel. Dans ce cas le complexe aptamère/cible est en principe séparé des molécules libres, mais la récupération des échantillons est fastidieuse.

Des méthodes particulières sont employées lorsque l'aptamère est le produit modifié d'une réaction enzymatique [10, 11] ou, inversement, lorsque l'aptamère acquiert lui-même des propriétés catalytiques et engendre des produits de réaction [12]. Une méthode de sélection originale, fondée sur la forte affinité entre la biotine et la streptavidine [11] a permis de sélectionner rapidement des aptamères dérivés des ARN de transfert qui sont amino-acylables par des aminoacyl-ARNt synthétases. Cette sélection repose sur la capture des molécules aminoacylées, préalablement fonctionnalisées par la biotine sur le groupement aminé libre de l'acide aminé, par des billes magnétiques recouvertes de streptavidine.

### **Aptamères passifs d'ARN ou d'ADN**

Le Tableau II donne quelques exemples d'aptamères passifs et illustre la diversité des cibles « aptes » à reconnaître des structures oligonucléotidiques. Pour des molécules simples (acides aminés, analogues de bases nucléiques, antibiotiques, vitamines...), quelques cycles de sélection ont permis d'obtenir des oligonucléotides – en général des ARN – présentant une affinité élevée. Ces aptamères, longs de quelques

dizaines de nucléotides, montrent une sélectivité remarquable pour le ligand contre lequel ils ont été dirigés. Ainsi, un aptamère ARN capable de lier la théophylline (une purine modifiée) avec une constante d'association de  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , a été isolé [15]. Cet aptamère, en forme d'épingle à cheveux avec une boucle interne et une hernie, présente une grande sélectivité car il reconnaît la caféine, qui ne diffère de la théophylline que par un simple groupement méthyle, avec une affinité 10 000 fois plus faible. Dans ce cas, l'enrichissement de la population en candidats spécifiques pour la théophylline a été amélioré par une étape de « contre-sélection » : les ARN retenus sur la colonne de théophylline ont été d'abord soumis à élution par une solution de caféine permettant ainsi l'élimination des séquences ne pouvant discriminer entre les deux dérivés puriques.

On dispose de données structurales tridimensionnelles, sur les molécules isolées ou complexées à leur cible, pour certains aptamères dirigés contre de petits ligands [23]; c'est le cas, entre autres, de l'arginine [24] et de l'ATP [23]. Pour l'aptamère anti-arginine une étude par résonance magnétique nucléaire (RMN) a révélé une structure en épingle à cheveux renfermant deux boucles internes asymétriques. Cette structure est relâchée à l'état libre mais se stabilise lorsque l'arginine est liée [24].

Des aptamères ont été sélectionnés contre de nombreuses macromolécules, au premier rang desquelles des protéines possédant une affinité naturelle pour les acides nucléiques. On peut citer, par exemple, des aptamères ARN ou ADN dirigés contre des polymérases [3], des amino-acyl-ARNt synthétases [9, 21], des facteurs d'initiation et d'élongation [10] de la synthèse protéique, des protéines ribosomiques [25]. A côté des études destinées à affiner la connaissance des sites fonctionnels de ces protéines [21, 26], des expériences de sélection *in vitro* ont permis d'isoler des aptamères ARN contre des protéines bactériennes ou virales: le facteur de terminaison de transcription Rho et la protéine ribosomique S1 d'*E. coli*, les protéines Rev et Tat du virus de l'immunodéficience

Tableau I  
EXEMPLES DE TECHNIQUES DE SÉLECTION ET LEURS APPLICATIONS

Méthode de sélection	Application à la sélection de...	Réf	Commentaires
<b>Sélection sur critères d'association</b>			
Rétention de complexes ARN/protéine sur filtres de nitrocellulose	aptamères du domaine de fixation au ribosome de l'ARNm codant pour l'ADN polymérase (protéine gp43) du bactériophage T4	[3]	sélection pour une rétention de 0,1 % de l'ARN d'une banque de 65 536 espèces moléculaires (ARN ayant une affinité jusqu'à 60 fois supérieure à celle de l'ARN sauvage)
Rétention d'oligonucléotides sur colonnes de chromatographie par affinité	aptamères ARN reconnaissant des colorants	[4]	par exemple utilisation de colonnes de Cibacron 3G
	aptamères ADN reconnaissant la thrombine	[7]	les complexes aptamère/thrombine sont dissociés de la colonne de concanavaleine A par un sucre
Retard sur gel de polyacrylamide	aptamère ADN liant les protéines E2A et MyoD possédant le motif hélice – coude – hélice	[8]	identification d'un site de fixation consensus double brin (« évolution moléculaire »)
<b>Sélection sur critères d'activité</b>			
Rétention de complexes d'ARN, produits de réaction, et de protéine sur filtres de nitrocellulose	aptamères ARNt amino-acylés par des amino-acyl-ARNt synthétases	[9, 10]	sélection des ARNt amino-acylés par complexation avec le facteur d'élongation EF-Tu
Capture d'ARN, produits de réaction biotinylés, par affinité avec la streptavidine	aptamères ARNt amino-acylés par des amino-acyl-ARNt synthétases	[11]	cette méthode s'applique à tous les acides aminés sauf la proline
Amplification sélective des ARN ayant une certaine réaction chimique	aptamères catalytiques	[12]	ribozymes dérivés de l'intron <i>Tetrahymena</i> ayant acquis la propriété de cliver de l'ADN

humaine de type 1 (VIH-1) [20] constituent quelques exemples. Ces expériences ont permis de sélectionner des motifs très éloignés des motifs naturellement reconnus par ces protéines. Ainsi, les aptamères identifiés, au sein d'une population ARN comportant une séquence aléatoire de 40 nucléotides, après 10 tours de sélection contre Tat, sont des structures en tige-boucle imparfaite qui ont peu de ressemblance avec le motif ARN responsable de la transactivation de la transcription des gènes viraux *TAR* du VIH-1, site de fixation biologique de Tat [20]. Dans certains cas, les séquences isolées par sélection possèdent pour

leur ligand une affinité plus forte que la séquence biologique. C'est le cas, par exemple, des aptamères anti-Rev dont les meilleurs ont un  $K_d$  inférieur de 10 fois à celui de l'ARN RRE (*Rev responsive element*) du VIH-1, site de fixation naturel de la protéine Rev [26]. Cela pourrait d'ailleurs être un cas assez général pour les aptamères sélectionnés contre des protéines se fixant naturellement sur les acides nucléiques. En effet, l'évolution naturelle a optimisé les couples protéines-acides nucléiques pour une fonction biologique impliquant de nombreux paramètres (réversibilité des complexes, interactions avec d'autres partenaires) qui peuvent

être incompatibles avec une constante d'association trop élevée. Au contraire, le cahier des charges de la sélection *in vitro* par affinité ne prend en compte que ce seul critère et optimise donc l'aptamère indépendamment de la fonction. On peut aussi remarquer que ces expériences de sélection font fréquemment émerger des motifs caractéristiques tels des pseudo-nœuds [20] ou des tétrades de G [27] (*figure 2*). Il est vraisemblable que l'un des rôles de ces motifs est de constituer une ossature permettant de présenter les nucléotides localisés dans les boucles dans des conformations favorables à l'interaction avec la cible.



Tableau II						
QUELQUES EXEMPLES D'APTAMÈRES PASSIFS ARN OU ADN						
Fonction	Cible	N	B	C	Réf	Commentaires
<b>Aptamères « ARN » à capacité de reconnaissance</b>						
<b>Aptamères pour cibles de petite taille</b>						
Ligand d'acides aminés	arginine	70	10 <sup>15*</sup>	20	[13]	aptamères à affinité accrue par rapport aux meilleurs complexes naturels ARN/arginine
Ligand de nucléotides ou de bases nucléiques	ATP	120	10 <sup>14*</sup>	8	[14]	famille de petits aptamères qui possèdent une séquence consensus de 11 nts
	théophylline	40	10 <sup>13</sup>	8	[15]	aptamères en épingle à cheveux
Ligand de colorants	bleu Cibacron 3G-A	22	10 <sup>13</sup>	5-6	[16]	environ 500 ARN qui lient le colorant ont été isolés
Ligand d'analogues de transition	dérivé d'un hexachloronorbornene, analogue d'état de transition d'une réaction de Diels-Alder	80	10 <sup>14*</sup>	20	[17]	sélection de 196 structures en épingles à cheveux avec des bulles internes
<b>Aptamères pour cibles macromoléculaires</b>						
Ligand de facteurs protéiques	facteur d'initiation eucaryote	40	>10 <sup>15</sup>	8	[18]	sélection d'un ensemble d'ARN à structures en épingles à cheveux irrégulières
	facteur d'élongation procaryote	9	10 <sup>5</sup>	6	[10]	15 structures minimalistes d'ARNt <sup>Ala</sup> amino-acylés liant EF-Tu aussi bien que l'ARN sauvage
Ligand d'enzymes	élastase humaine	40 <sup>a</sup>	10 <sup>14*</sup>	np	[19]	3 familles d'aptamères, dont des structures en « tétrade de G »
	transcriptase inverse du VIH	32	10 <sup>14*</sup>	9	[20]	sélection d'aptamères structurés en pseudo-nœud
<b>Aptamères « ARN » substrats d'enzymes</b>						
Substrat d'amino-acyl-ARNt synthétases	phénylalaninyl-ARNt synthétase	14	10 <sup>8</sup>	6+1 <sup>b</sup>	[9]	les nts mutagénéisés contiennent des éléments d'identité: sélection de 6 nouveaux ARNt <sup>Phe</sup> actifs
<b>Aptamères « ADN » à capacité de reconnaissance</b>						
Ligand d'enzymes	thrombine humaine	60	10 <sup>13*</sup>	5	[7]	plus de 30 aptamères sélectionnés, certains à structure en « tétrade de G »
	valine misactivée <sup>c</sup> liée à l'isoleucyl-ARNt synthétase	25	10 <sup>14</sup>	7	[21]	aptamère unique qui mime l'action de l'ARNt <sup>Ile</sup> pour induire la réaction d'édition de la synthétase (pas d'analogie de séquence avec un ARNt)
Ligand de nucléotides	adénosine et ATP	72	10 <sup>14</sup>	8	[22]	le domaine de fixation de l'ATP comporte 2 « tétrades de G » empilées

*N*, nombre de nucléotides dégénérés; *B*, taille des banques en nombre d'oligonucléotides; *C*, nombre de cycles de sélection effectués; *nt(s)*, nucléotide(s); \*, banque partielle; np, non précisé; <sup>a</sup>, la banque contient des pyrimidines (C et U) avec des 2'-amino riboses (cela permet de sélectionner des aptamères à stabilité chimique accrue; voir Tableau IV); <sup>b</sup>, 6 cycles de sélection se font selon le critère d'affinité avec la synthétase et le 7<sup>e</sup> cycle selon le critère d'amino-acylation; VIH, virus de l'immunodéficience humaine; EF-Tu: facteur d'élongation; <sup>c</sup>, lors de l'étape d'aminoacylation des ARN de transfert, les aminoacyl-ARNt synthétases procèdent à la charge des ARNt par un mécanisme en 2 étapes: une synthétase spécifique active d'abord son acide aminé spécifique en aminoacyl-adénylate, puis assure son transfert sur l'ARNt. L'isoleucyl-ARNt synthétase est également capable d'activer la valine, d'où la dénomination de valine misactivée. La nature a mis en place des mécanismes de correction: il s'agit des réactions d'édition par les synthétases, ce qui est indiqué dans le tableau où il est dit que l'ARNt isoleucine induit la réaction d'édition (donc de correction de cette misactivation). L'action de l'aptamère en question mime cette activité d'édition.

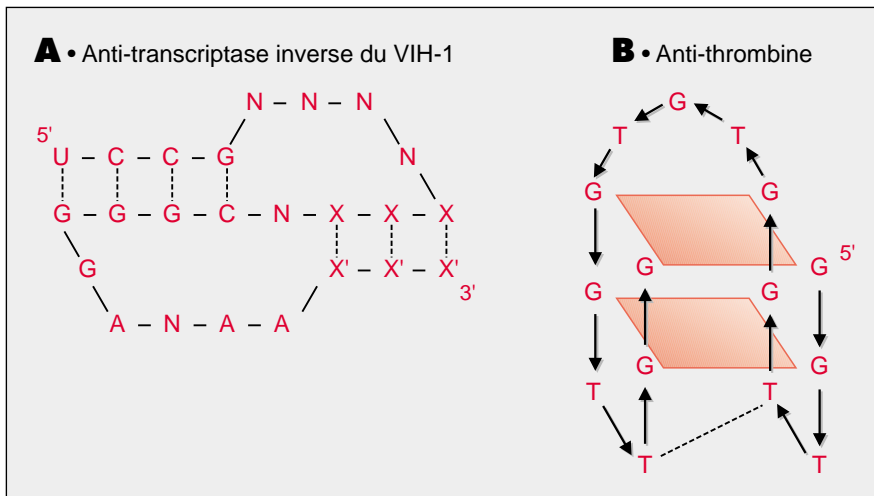


Figure 2. **Structure d'aptamères.** **A.** Aptamère ARN anti-transcriptase inverse du VIH-1. Cet oligonucléotide adopte une organisation en pseudo-nœud. Les bases nucléiques indispensables pour la fixation de cet aptamère à sa cible sont indiquées par A (adénine), U (uracile), C (cytosine) ou G (guanine). N indique n'importe laquelle des quatre bases. X et X' symbolisent des paires A-U(U-A) ou G-C(C-G) (voir [20]). **B.** Aptamère ADN anti-thrombine. Le repliement de la chaîne de l'oligomère GGTTGGTGTGGTTGG montre la formation de deux tétrades de G (carrés rouges) (voir [27]). Le lien en pointillés indique une interaction entre deux bases.

On peut également extraire de populations synthétisées de façon aléatoire, des séquences dirigées contre des acides nucléiques. Il peut sembler paradoxal d'utiliser cette approche pour identifier des oligomères capables de se fixer à un ARN ou à un ADN dans la mesure où les règles essentielles permettant l'édification de complexes sont connues: appariements de type Watson-Crick pour la formation d'un double brin à partir d'une cible en simple brin et interactions de type Hoogsteen ou Hoogsteen inversées pour la fixation d'un troisième brin dans le grand sillon d'une double hélice. C'est d'ailleurs le principe des approches antisens et triplex (« anti-gène ») [28, 53]. Cependant, les repliements intramoléculaires souvent très sophistiqués des ARN et le répertoire étroit des triples brins limitent l'utilisation de ces approches [29].

On pouvait donc envisager de rechercher par sélection *in vitro* des séquences capables, d'une part, d'élargir le répertoire des triples hélices et, d'autre part, d'accommoder des motifs ARN repliés. Il a été possible d'identifier des oligonucléotides dirigés contre des structures secondaires en épingle à cheveux ADN ou ARN. Ces séquences font

intervenir, à côté des paires conventionnelles A-T (ou A-U) et G-C des interactions non identifiées qui stabilisent les complexes. Ainsi, des aptamères ADN capables de s'associer à des ADN structurés ont été caractérisés [30]. Enfin, la recherche d'aptamères contre des acides nucléiques peut permettre d'isoler de nouveaux « ribozymes », c'est-à-dire des ARN doués d'activités catalytiques. Ce domaine a donné naissance à de très nombreux développements qui seront discutés plus loin.

Les exemples précédents ne doivent pas conduire à penser que la sélection d'oligonucléotides est restreinte à des cibles macromoléculaires interagissant naturellement avec des acides nucléiques. De fait, des aptamères ont été sélectionnés contre des protéines dont la fonction connue n'implique pas de fixation à l'ADN ou à l'ARN. Ainsi, des aptamères possédant une affinité voisine de 0,1  $\mu\text{M}$  pour le *nerve growth factor* (NGF) humain, ont été isolés à partir d'une banque d'ARN comportant une séquence aléatoire de 30 résidus [1]. Bien que des aptamères de forte affinité pour le ligand choisi soient assez systématiquement identifiés, le processus de sélection *in vitro* ne saurait garantir que les séquences isolées

montrent des propriétés inhibitrices d'une activité enzymatique portée par la cible contre laquelle les aptamères ont été dressés. En effet, le complexe peut faire intervenir des régions de la protéine cible non essentielles à l'activité catalytique ou encore la fixation de l'aptamère peut ne pas induire de déformation du site actif. Une solution a récemment été proposée dans le cas de l'élastase humaine. Les aptamères produits au terme de 14 tours de sélection présentaient une forte affinité pour cette protéase, mais pas de propriété inhibitrice. Ils ont alors été couplés à un tétrapeptide connu pour être un inhibiteur faible. La chimère résultante possède une constante d'inhibition  $K_i$  environ  $10^5$  fois plus élevée que le peptide seul [31] (voir aussi Tableau IV).

De nombreux autres exemples d'aptamères identifiés contre des protéines ne présentant pas naturellement d'affinité pour les acides nucléiques peuvent être cités: ont ainsi été isolés des oligonucléotides montrant une forte affinité pour une L sélectine, pour le neuropeptide P, ou pour des IgE humaines (voir [1, 32] pour des revues).

### Aptamères catalytiques, processus d'évolution et « Monde à ARN »

Le Tableau III donne un aperçu d'aptamères ARN, et même ADN, doués d'activité catalytique. Il montre aussi que des ribozymes artificiels peuvent mimer plusieurs des réactions biochimiques fondamentales à la vie. Par ailleurs, les grands ribozymes naturels peuvent être soumis à des processus d'évolution darwinienne. Ainsi, le ribozyme de l'intron autocatalytique de *Tetrahymena*, une enzyme à ARN qui catalyse des réactions d'excision et de ligation d'ARN, a été soumis à une pression de sélection pour le transformer en un enzyme capable de cliver l'ADN [12].

Le protocole mis en œuvre peut être considéré comme une technique sophistiquée de mutagenèse dirigée, puisqu'il s'agit de choisir très précisément dans une grande structure un nombre limité de nucléotides à dégénérer. Dans le cas présent, 140 nucléotides ont été dégénérés à par-

Tableau III						
QUELQUES EXEMPLES D'APTAMÈRES CATALYTIQUES						
Fonction	Cible	N	B	C	Réf	Commentaires
<b>Aptamères «ARN» à activité catalytique (ribozymes artificiels)</b>						
Clivage d'ADN	ADN 25-mère modèle de l'ADNc de VIH-1	140 –	14 <sup>13*</sup> 27	10	[12] [33]	sélectionné à partir du ribozyme de <i>Tetrahymena</i> évolution du ribozyme précédent [12] pour en faire un agent thérapeutique
Clivage d'ARN	ARN dans un ribozyme à « tête de marteau »	4	256	2	[34]	les ribozymes sélectionnés coupent en <i>cis</i>
Ligation d'ARN	tige boucle avec coupure dans la tige (ligation entre C <sub>3'OH</sub> et G <sub>5'ppp</sub> )	220	>10 <sup>15*</sup>	10	[35]	3 classes de ligases, dont 1 ribozyme avec un domaine catalytique minimum de 93 nts et un <i>turnover</i> > 1 s <sup>-1</sup>
Alkylation de peptides	bradykinine	30	10 <sup>13</sup>	12	[36]	cet aptamère catalyse une réaction d'alkylation mimant une activité de glutathion N transférase
Acylation d'ARN	phénylalaninyl-adénosine monophosphate	50	10 <sup>14*</sup>	11	[37]	29 aptamères, mimes de la phénylalaninyl-ARNt synthétase, qui s'auto-aminoacylent (réactions accélérées ≥ 105 fois et nécessitant MgCl <sub>2</sub> et Ca <sup>2+</sup> )
<b>Aptamères «ADN» à activité catalytique</b>						
Clivage d'ADN	aptamères autoclivables	50	10 <sup>13</sup>	8	[38]	2 familles d'ADN sélectionnés requérant des ions Cu <sup>2+</sup> et de l'ascorbate comme co-facteurs
Clivage d'ARN	quasiment tous les ARN	12	10 <sup>14</sup>	10*	[39]	petits ADN avec un domaine catalytique de 15 nts flanqué de séquences qui ciblent l'ARN à cliver; requièrent des ions Mg <sup>2+</sup> comme co-facteurs

Voir Tableau II pour la signification des symboles et abréviations. \* Ingénierie des molécules après les cycles de sélection pour les adapter aux séquences cibles.

tir de la séquence du ribozyme longue de 435 résidus. En fait 4 oligonucléotides couvrant le cœur catalytique du ribozyme ont été mutés, chacun à 35 positions, avec un taux de variation de 5% à chaque position. D'un point de vue pratique, la banque de départ contenait 20 picomoles de matériel, soit 10<sup>13</sup> molécules à cribler. Après 10 cycles de sélection, des aptamères répondant au critère de sélection ont été mis en évidence. Cette expérience illustre bien le principe biologique de l'évolution, selon lequel les nouvelles molécules se créent à partir d'un nombre fini d'événements de muta-

genèse sur une molécule connue, et non à partir d'un ensemble de possibles beaucoup plus grand (ici l'ensemble complet, entièrement dégénéré, aurait représenté 4<sup>140</sup> = 10<sup>84</sup> molécules, un nombre sans signification physique réelle). L'hypothèse du « Monde à ARN » [40] à partir duquel aurait émergé la vie [41] trouve une base d'expérimentation solide grâce à l'étude des ribozymes naturels et de leur évolution *in vitro*, et à la possibilité de créer des aptamères catalytiques capables de répliquer l'ARN et de synthétiser des peptides [42]. Dans cette optique, il est intéressant de

noter que les ribozymes des introns de groupe I catalysent des réactions apparentées aux polymérisations [43] et que leur évolution *in vitro* a déjà conduit à l'émergence d'aptamères à activité de ligase [35] et d'une polymérase primitive capable d'allonger un ARN amorce hybridé à une matrice [43]. La transition d'un « Monde » strictement à ARN à un « Monde » plus moderne où coexistaient acides nucléiques et protéines présuppose l'émergence de la machinerie de synthèse protéique. Cela aurait pu se faire grâce à un ensemble de ribozymes capables d'assurer les étapes clés du processus



de traduction moderne. Ainsi, des aptamères qui reconnaissent des acides aminés ont été créés [1, 13] et l'auto-amino-acylation d'aptamères sélectionnés pour mimer la réaction d'amino-acylation des ARN de transfert a été démontrée [37]. Les travaux dans ce domaine n'en sont qu'à leurs débuts et on peut prévoir qu'ils vont s'orienter dans deux directions: la recherche et l'étude de fossiles moléculaires dans les processus modernes de réplication et de traduction, sans doute reliés d'un point de vue évolutif, et l'évolution d'aptamères ARN dérivés de telles structures ancestrales, y compris les ribozymes actuels, vers des fonctions qui récapitulent certains des processus fondamentaux de la vie.

Pour terminer il ne faut pas oublier les petits acides nucléiques catalytiques, ribozymes [34] ou nucléases artificielles à ADN [38, 39], qui peuvent être créés ou modifiés par les méthodes combinatoires. Nous citerons des aptamères ADN dont l'activité dépend de la présence d'ions métalliques divalents; ces molécules d'une cinquantaine de nucléotides s'autoclivent en présence de  $\text{Cu}^{2+}$  par un mécanisme oxydatif [38] qui s'oppose au mécanisme hydrolytique classique mis en œuvre par les ribozymes dans lequel la présence de groupements 2'-hydroxyle sur les riboses des ARN joue un rôle essentiel. D'autres petits aptamères ADN clivent des séquences ciblées d'ARN dans des conditions « physiologiques » en présence de  $\text{Mg}^{2+}$ . Ces molécules remarquables sont les enzymes « acide nucléique » les plus efficaces mises au point à ce jour [39]. Elles peuvent fonctionner pendant de nombreux cycles catalytiques avec des efficacités comparables à celles de ribonucléases protéiques ( $k_{\text{cat}}/K_m = 10^9$ ) et certaines d'entre elles ont été créées pour cliver des séquences spécifiques de l'ARN messager de VIH-1.

### Applications à potentiel thérapeutique

La sélection peut être dirigée contre des cibles d'intérêt pharmacologique afin d'engendrer des aptamères inhibiteurs d'une fonction protéique ou d'une activité enzymatique. Par exemple, si la cible en question est

une protéine virale essentielle, les aptamères pourraient interférer avec l'accomplissement du cycle viral. De même, lorsque la cible est une séquence caractéristique du génome viral, des aptamères à fonction nucléasique pourraient cliver cette séquence et ainsi empêcher la multiplication du virus. Ces pistes ont été explorées dans le cas des rétrovirus et plus particulièrement dans celui du VIH. C'est ainsi que des aptamères ARN ont été sélectionnés contre les protéines Rev et Tat du VIH-1 [20]. D'autres cibles de choix dans le cas des rétrovirus sont leurs transcriptases inverses contre lesquelles des aptamères ARN et ADN ont été recherchés. De façon remarquable, parmi les aptamères dirigés contre la transcriptase inverse du VIH-1, ceux qui possèdent une affinité très forte pour l'enzyme ( $K_d = 5 \text{ nM}$ ) s'organisent en une structure en pseudo-nœud (figure 2) dont de nombreuses positions sont essentielles à la formation du complexe, comme l'ont montré des études d'interférence par modification chimique [20]. Le processus de sélection mené à partir d'une banque d'ADN a conduit à des séquences totalement différentes des séquences ARN [44]. Ces aptamères ADN se fixent à la transcriptase inverse avec une affinité du même ordre de grandeur que les aptamères ARN. En outre, les deux classes d'aptamères montrent des propriétés inhibitrices de l'activité polymérase ( $K_i = 0,5 \text{ nM}$ ) de la transcriptase inverse du VIH-1. Ces effets sont spécifiques de l'enzyme du VIH-1 car l'inhibition des activités correspondantes des enzymes homologues des rétrovirus murin (MMLV) et aviaire (AMV) est faible. Il a, par ailleurs, été possible d'identifier des aptamères efficaces contre les transcriptases inverses d'AMV et de MMLV [1, 20]. Tous ces oligonucléotides ne montrent aucun motif commun. L'ensemble de ces résultats indique l'extraordinaire potentiel des approches de sélection *in vitro* puisqu'il a été possible d'engendrer des ligands qui discriminent entre des protéines homologues dont les sites actifs sont voisins.

Une stratégie alternative qui pourrait permettre d'inhiber le cycle du VIH-1 a consisté à cibler plusieurs séquences de 6 à 12 nucléotides de

l'ADNc de ce virus. Des nucléases ADN ont été produites à partir du ribozyme de l'intron autocatalytique de *Tetrahymena* qui a été modifié au niveau de sa séquence guide interne (IGS) de telle sorte qu'il puisse s'hybrider spécifiquement à des régions stratégiques du génome [33]. Le meilleur exemple actuel de l'intérêt pharmacologique des aptamères est sans doute celui de la thrombine, une protéase impliquée dans le processus de coagulation sanguine. Une banque d'ADN comportant une fenêtre aléatoire de 60 nucléotides a été criblée par affinité contre une colonne sur laquelle avait été immobilisée la thrombine. Après 5 tours de sélection la population montrait une fixation préférentielle pour la thrombine par rapport au fibrinogène humain et à l'ovalbumine. Après clonage et séquençage, l'analyse de 32 clones faisait apparaître un motif double, espacé de façon variable: GGTTGGN<sub>x</sub>GGNTGG (N désigne un nucléotide quelconque). Ces aptamères se fixent à la thrombine avec une affinité de l'ordre de 200 nM [7]. Des études de RMN et de cristallographie aux rayons X ont montré que le pentadécamère consensus GGTTGGTGTGGTTGG s'organise en une structure comportant deux tétrades de G empilées l'une sur l'autre [27] (figure 2). L'hexamère GGTTGG possède des propriétés anticoagulantes significatives à des concentrations voisines de 25  $\mu\text{M}$ . Le pentadécamère est environ 200 fois plus efficace. Des oligonucléotides aléatoires de même taille n'ont aucune activité. Des études génétiques ont indiqué que la fixation de l'aptamère sur la thrombine intervenait à un site différent du site catalytique mais coïncidait avec une région connue pour fixer des cofacteurs et des inhibiteurs [32].

Des études *ex vivo* démontrent l'intérêt de l'aptamère anti-thrombine. Dans un modèle d'artère de lapin lésée et perfusée avec du sang humain, cet aptamère s'est montré plus efficace que l'héparine et aussi efficace qu'une anti-thrombine synthétique pour inhiber l'agrégation plaquettaire. Dans un essai de circulation extracorporelle sur des chiens, l'aptamère utilisé à 0,5 mg/kg/min a permis d'augmenter le temps de coagulation de 100 s à plus de 1 500 s. Le

temps de coagulation des animaux est revenu à la normale 5 minutes après l'arrêt de l'administration de l'aptamère et les saignements post-opératoires étaient minimaux [32]. L'utilisation d'aptamères dans un organisme vivant impose des contraintes bien connues de ceux qui développent des oligonucléotides antisens [28]. Les ADN et ARN naturels sont rapidement dégradés par les nucléases (le temps de demi-vie de l'aptamère anti-thrombine est de l'ordre de 100 s, *in vivo* chez le singe). Ces aptamères doivent donc être stabilisés par incorporation de nucléosides modifiés. Ces modifications chimiques peuvent être introduites *a posteriori*, c'est-à-dire après les étapes de sélection. Cependant, la conformation des oligonucléotides est extrêmement dépendante de la nature chimique de l'acide nucléique et la sélection, à partir de banques de chimies différentes conduit, pour une cible donnée, à des aptamères de structures différentes [1]. Si la substitution totale *a posteriori* d'un type de résidu par un autre, conduit généralement à un échec, on peut en revanche produire des molécules actives par substitution partielle en des positions qui ne sont pas critiques pour l'organisation tridimensionnelle de la molécule ou/et pour

l'interaction avec le ligand. Ainsi, la séquence 2'-O-méthyle (2'-OMe) correspondant au pseudo-nœud d'ARN sélectionné contre la transcriptase inverse du VIH-1 possède une faible affinité pour l'enzyme alors que l'aptamère partiellement modifié par des résidus 2'-OMe se fixe avec une affinité équivalente à la molécule non modifiée [45] (Tableau IV). Il est en fait préférable de réaliser la sélection sur une population d'oligomères comportant initialement la modification souhaitée. De très nombreux analogues ont été synthétisés dans le cadre de l'approche antisens, dont certains confèrent aux oligonucléotides une résistance aux nucléases. C'est le cas des dérivés 2'-OMe (figure 3). Cependant, la plupart d'entre eux, dont les 2'-OMe, ne sont pas incorporés par les polymérase et sont donc inutilisables pour la stratégie de sélection *in vitro* qui implique une étape d'amplification. Des stratégies combinatoires qui ne comportent pas d'étape enzymatique peuvent être mises en œuvre avec de tels complexes. Ces méthodes alternatives, applicables à tout type de composé, ne permettent d'explorer qu'un sous-ensemble de la population théorique et sont restreints à des séquences courtes. Une telle

méthode a par exemple été mise en œuvre pour identifier une séquence nonamérique, en série 2'-O-méthyle, interagissant avec l'ARN messager de H-Ras [54]. Au contraire, les nucléosides triphosphates comportant des pyrimidines modifiées en 2', par un groupement fluoro ou amino (figure 3), sont eux incorporés par les polymérase et permettent la synthèse d'oligonucléotides dont la résistance aux nucléases est significativement accrue. Ainsi, des aptamères comportant des 2'-amino pyrimidines, dirigés contre le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) et le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ont une constante de dissociation de l'ordre du nM et possèdent une stabilité accrue jusqu'à 1 000 fois dans le sérum humain [46]. Une solution élégante qui tire parti des propriétés d'isomérisation optique des macromolécules biologiques a été récemment proposée. Les acides nucléiques naturels sont les énantiomères D. Les énantiomères L, non naturels, sont eux résistants aux nucléases mais ne peuvent, bien sûr, être produits par polymérisation enzymatique. On pouvait supposer que si un oligonucléotide D s'associe à l'isomère L d'un ligand, l'isomère L de cet oligonucléotide serait alors capable de fixer l'isomère D du

Tableau IV  
APTAMÈRES MODIFIÉS CHIMIQUEMENT

Cible <sup>a</sup>	Chimie <sup>b</sup>	N (nts)	C <sup>c</sup>	K <sub>d</sub> (nM)	Références
HNE	2' NHpy	40	15	10	[19]
bFGF	2' NHpy	30/50	11	0,35	[47]
VEGF	2' NHpy	30/50	11	2,4	[46]
	(+ 2' OMe)		(+ ps)	(0,15)	
Ab-AChR	2' NHpy	40	15	60	[45]
HKGF	2' NHpy	40	15	0,4	[48]
	2' Fpy			0,001	
RSV	2' Fpy	40	15	0,5	[49]
Arg	L-RNA	50	15	135.000	[50]
Thrombine	Pent-U	20	15	400	[51]
REV	5 I-U	35	15	1	[52]
HNE	pept-conj	40	14 (+ ps)	7 (17)	[31]

voir Tableau II pour la signification des symboles N (nts) et C. K<sub>d</sub>, constante de dissociation. <sup>a</sup>, HNE = élastase (human neutrophil elastase); bFGF = facteur de croissance fibroblastique (basic fibroblast growth factor); VEGF = facteur de croissance vasculaire (vascular endothelial growth factor); Ab-AChR = anticorps antirécepteur acétylcholine (antibody acetylcholine receptor); HKGF = facteur de croissance des kératinocytes humains (human keratinocyte growth factor); RSV = virus du sarcome de Rous; Arg = arginine; REV = protéine du virus de l'immunodéficience humaine. <sup>b</sup>, 2' NHpy = 2'-amino riboside pyrimidique; 2' OMe = 2'-O-méthyl riboside; 2'Fpy = 2'-fluororiboside pyrimidique; Pent-U = 5 pentinyl uracile (voir figure 3); 5 I-U = 5-iodo uracile; pept-conj = conjugué oligopeptide-oligonucléotide. <sup>c</sup>, ps = modification post-sélection.

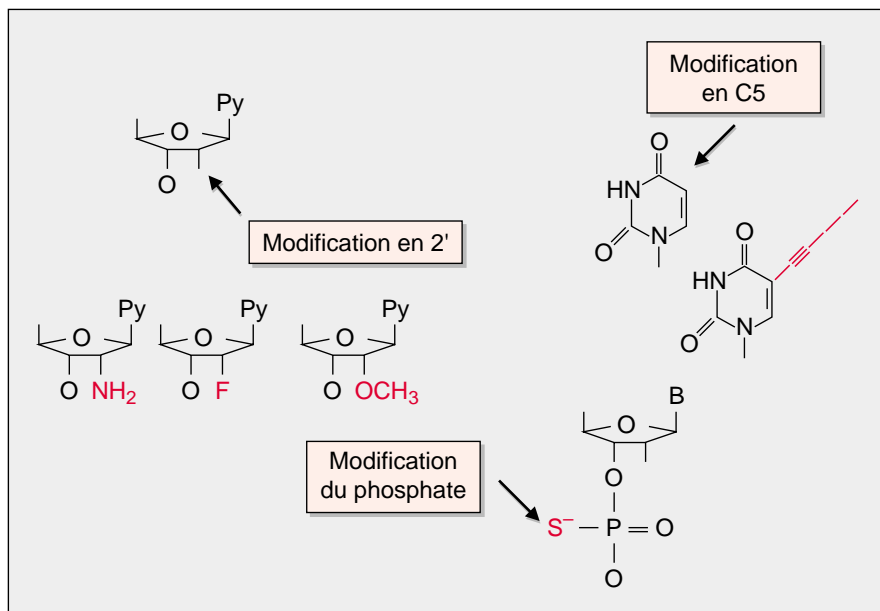


Figure 3. **Aptamères chimiquement modifiés.** Sont regroupés ici quelques analogues utilisés dans des séquences aptamères : modifications sur la position 2' du sucre (2'-amino, 2'-fluoro ou 2'-O-méthyle) d'un nucléoside pyrimidique (Py), sur la base (5-pentynyl-uracile) ou sur le lien internucléosidique (phosphorothiate). À l'exception des dérivés 2'-O-méthyle, ces analogues sont incorporés par les polymérases. Ces dérivés confèrent à l'aptamère une résistance accrue aux nucléases, à l'exception de l'uracile modifié en C5.

ligand. Cela a été démontré dans le cas d'un acide aminé : des aptamères ont été produits par sélection *in vitro* à partir d'une population de D-oligodésoxyribonucléotides contre l'isomère non naturel D de l'arginine. L'homologue de l'aptamère en série L, produit par synthèse chimique, fixe l'isomère naturel, la L-arginine. Cet isomère est capable de s'associer à un peptide de la protéine Tat du VIH-1 qui comporte cinq résidus arginine [50]. Cette stratégie a également été appliquée avec succès à l'adénosine.

On peut produire des aptamères non seulement contre une molécule isolée mais aussi contre des complexes multimoléculaires. Dans ce domaine, un exemple frappant concerne la sélection d'aptamères ARN contre le virus du sarcome de Rous (RSV) intact [49]. Les oligonucléotides obtenus après 12 tours de sélection, convertis en analogues 2'-fluoro, montrent des propriétés inhibitrices de l'invasion virale par suite de l'adsorption à la surface des virions.

## Perspectives et conclusion

Par ce tour d'horizon, notre ambition a été de montrer la richesse de l'approche combinatoire pour créer de nouvelles molécules d'ARN et d'ADN douées de propriétés originales. En fait les recherches sur les aptamères n'en sont qu'à leurs débuts et les applications à venir vont être nombreuses. Celles-ci vont concerner la biologie fondamentale avec, entre autres, la possibilité directe de tester des hypothèses évolutives, la chimie pour le développement de nouveaux catalyseurs macromoléculaires stéréospécifiques, et la médecine avec la possibilité de créer des médicaments de nouvelle génération contre des cibles macromoléculaires ■

## TIRÉS À PART

J.J. Toulmé.  
R. Giegé.

## RÉFÉRENCES

1. Gold L, Polisky B, Uhlenbeck O, Yarus M. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem* 1995; 64: 763-97.
2. Wang C, Yang Q, Craik C. Phage display of proteases and macromolecular inhibitors. *Methods Enzymol* 1996; 267: 52-68.
3. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 1990; 249: 505-10.
4. Szostak JW. *In vitro* genetics. *Trends Biochem Sci* 1992; 17: 89-93.
5. Robertson DL, Joyce GF. Selection *in vitro* of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* 1990; 344: 467-8.
6. Estaquier J, Gras-Masse H, Boutillon C, Ameisen J, Capron A, Tartar A, Auriault C. The mixotope: a combinatorial peptide library as a T cell and B cell immunogen. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2789-95.
7. Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* 1992; 355: 564-6.
8. Blackwell TK, Weintraub H. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 1990; 250: 1104-10.
9. Tinkle Peterson E, Blank J, Sprinzl M, Uhlenbeck O. Selection for active *E. coli* tRNA<sup>Phe</sup> variants from a randomized library using two proteins. *EMBO J* 1993; 12: 2959-67.
10. Nazarenko IA, Uhlenbeck OC. Defining a smaller RNA substrate for elongation factor Tu. *Biochemistry* 1995; 34: 2545-52.
11. Pütz J, Wientges J, Sissler M, Giegé R, Florentz C, Schwienhorst A. Rapid selection of aminoacyl-tRNAs based on biotinylation of alpha-NH2 group of charged amino acids. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 1862-3.
12. Beaudry AA, Joyce GF. Directed evolution of an RNA enzyme. *Science* 1992; 257: 635-41.
13. Geiger A, Burgstaller P, Von Der Eltz H, Roeder A, Famulok M. RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constant and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1029-36.
14. Sassanfar M, Szostak JW. An RNA motif that binds ATP. *Nature* 1993; 364: 550-3.
15. Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* 1994; 263: 1425-9.
16. Ellington AD, Szostak JW. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990; 346: 818-22.
17. Morris KN, Tarasow T, Julin CM, Simons SL, Hilvert D, Gold L. Enrichment for RNA molecules that bind a Diels-Alder transition state analog. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 13028-32.

## RÉFÉRENCES

18. Méthot N, Pickett G, Keene JD, Sonenberg N. *In vitro* RNA selection identifies RNA ligands that specifically bind to eukaryotic translation initiation factor 4B: the role of the RNA recognition motif. *RNA* 1996; 2: 38-50.
19. Lin Y, Qiu Q, Gill SC, Jayasena SD. Modified RNA sequence pools for *in vitro* selection. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 5229-34.
20. Tuerk C, MacDougall-Waugh S. *In vitro* evolution of functional nucleic acids: high-affinity RNA ligands of HIV-1 proteins. *Gene* 1993; 137: 33-9.
21. Hale SP, Schimmel P. Protein synthesis edition by a DNA aptamer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2755-8.
22. Huizenga DE, Szostak JW. A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry* 1995; 34: 656-65.
23. Feigon J, Dieckmann T, Smith F. Aptamer structures from A to dzeta. *Chem Biol* 1996; 3: 611-7.
24. Yang YS, Kochoyan M, Burgstaller P, Westhof E, Famulok M. Structural basis of ligand discrimination by two related RNA aptamers resolved by NMR spectroscopy. *Science* 1996; 272: 1343-7.
25. Moine H, Cachia C, Westhof E, Ehresmann B, Ehresmann C. The RNA binding site of S8 ribosomal protein of *Escherichia coli*: Selex and hydroxyl radical probing studies. *RNA* 1997; 3: 255-68.
26. Bartel DP, Zapp ML, Green MR, Szostak JW. HIV-1 rev regulation involves recognition of non-Watson-Crick base pairs in viral RNA. *Cell* 1991; 67: 529-36.
27. Kelly JA, Feigon J, Yeates TO. Reconciliation of the X-ray and NMR structures of the thrombin-binding aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG). *J Mol Biol* 1996; 256: 417-22.
28. Hélène C, Toulmé JJ. Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1049: 99-125.
29. Toulmé JJ, Le Tinévez R, Brossalina E. Targeting RNA structures by antisense oligonucleotides. *Biochimie* 1996; 78: 663-73.
30. Mishra RK, Le Tinévez R, Toulmé JJ. Targeting nucleic acid secondary structures by antisense oligonucleotides designed through *in vitro* selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10679-84.
31. Lin Y, Padmapriya A, Morden KM, Jayasena SD. Peptide conjugation to an *in vitro*-selected DNA ligand improves enzyme inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11044-8.
32. Ellington AD, Conrad R. Aptamers as potential nucleic acid pharmaceuticals. *Bio-tech Ann Rev* 1995; 1: 185-215.
33. Raillard S, Joyce G. Targeting sites within HIV-1 cDNA with a DNA-cleaving ribozyme. *Biochemistry* 1996; 35: 11693-701.
34. Thomson J, Sigurdson S, Zeuch A, Eckstein F. *In vitro* selection of hammerhead ribozymes containing a bulged nucleotide in stem II. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 4401-6.
35. Eklund EH, Szostak JW, Bartel DP. Structurally complex and highly active RNA ligases derived from random RNA sequences. *Science* 1995; 269: 364-70.
36. Wecker M, Smith D, Gold L. *In vitro* selection of a novel catalytic RNA: characterization of a sulfur alkylation reaction and interaction with a small peptide. *RNA* 1996; 2: 982-94.
37. Illangasekare M, Sanchez G, Nickles T, Yarus M. Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA. *Science* 1995; 267: 643-7.
38. Carmi N, Shultz L, Breaker R. *In vitro* selection of self-cleaving DNAs. *Chem Biol* 1996; 3: 1039-46.
39. Santoro SW, Joyce GF. A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4262-6.
40. Gilbert W. The RNA world. *Nature* 1986; 319: 618.
41. Joyce G. RNA evolution and the origin of life. *Nature* 1989; 338: 217-24.
42. Hager A, Pollard J, Szostak J. Ribozymes: aiming at RNA replication and protein synthesis. *Chem Biol* 1996; 3: 717-25.
43. Eklund EH, Bartel DP. RNA-catalyzed RNA polymerization using nucleoside triphosphates. *Nature* 1996; 382: 373-6.
44. Schneider DJ, Feigon J, Hostomsky Z, Gold L. High-affinity ssDNA inhibitors of the reverse transcriptase of type I human immunodeficiency virus. *Biochemistry* 1995; 34: 9599-610.
45. Lee S, Sullenger BA. Isolation of a nuclease resistant decoy RNA that can protect human acetylcholine receptors from myasthenic antibodies. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 41-5.
46. Green LS, Kirschenheuter GP, Charlton J, Guidot DM, Repine JM. Nuclease resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Chem Biol* 1995; 2: 683-95.
47. Jellinek D, Green L, Bell C, Lynott CK, Gill N, Vargeese C, Krischenheuter G, McGee DPC, Abesinghe P, Pieken WA, Shapiro R, Rifkin DB, Moscatelli D, Janjic N. Potent 2'-amino-deoxypyrimidine RNA inhibitors of basic fibroblast growth factor. *Biochemistry* 1995; 34: 11363-72.
48. Pagratis N, Bell C, Chang Y, Jennings S, Fitzwater T, Jellinek D, Dang C. Potent 2'-amino-, and 2'-fluoro-2'-deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 68-73.
49. Pan W, Craven RB, Qui Q, Wilson CB, Wills JW, Golovine S, Wang JF. Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11509-13.
50. Nolte A, Klussmann S, Bald R, Erdmann VA, Furste JP. Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 1116-9.
51. Latham JA, Johnson R, Toole JJ. The application of a modified nucleotide in aptamer selection: novel thrombin aptamers containing 5-(1-pentynyl)-2'-deoxyuridine. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 2817-22.
52. Jensen KB, Atkison MC, Willis M, Koch TH, Gold L. Using *in vitro* selection to direct the covalent attachment of human immunodeficiency virus type I Rev protein to high-affinity RNA ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12220-4.
53. Hélène C, Saison-Behmoaras E. La stratégie antisens: nouvelles approches thérapeutiques. *Med Sci* ; 10: 253-73.
54. Ecker DJ, Vickers TA, Hanecak R, Driver V, Anderson K. Rational screening of oligonucleotide combinatorial libraries for drug discovery. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 1853-6.

## Remerciements

Nous remercions l'Inserm pour nous avoir permis d'organiser en 1997 l'Atelier « Stratégies combinatoires pour la sélection d'oligonucléotides à fonction prédéfinie, les aptamères » (Atelier 90). La rédaction de cet article a été motivée par cet atelier. Les travaux sur les aptamères de l'équipe de J.J. Toulmé sont financés par l'Inserm, l'Anrs et le Conseil Régional d'Aquitaine. Ceux de l'équipe de R. Giégé sont soutenus par le Cnrs et l'Université Louis-Pasteur.

## Summary

### Aptamers: ligands and catalysts obtained by *in vitro* selection

Modern molecular biology allows to explore the combinatorial diversity of nucleic acids and to create novel RNA and DNA molecules, the aptamers, able to recognize selected ligands or to catalyze chemical or biochemical reactions. The concepts underlying the design of oligonucleotide libraries and the methodologies to be used for selecting aptamers are presented. Specific examples illustrating the potential of combinatorial *in vitro* selection procedures to explore the RNA World and basic mechanisms of molecular evolution, to understand the function of macromolecular systems involving natural nucleic acids, and to create completely artificial aptamers without any resemblance with existing molecules are discussed. Special emphasis is given to aptamers with potential biomedical applications.