Evolution dirigée de macromolécules biologiques

Michael RYCKELYNCK

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

03.90.24.52.17
m.ryckelynck@isis.u-strasbg.fr

Evolution dirigée de macromolécules biologiques

I. Introduction à l'évolution dirigée

II. Création de la diversité génétique

III. Stratégies de sélection en évolution dirigée

IV. Compartimentation *in vitro*

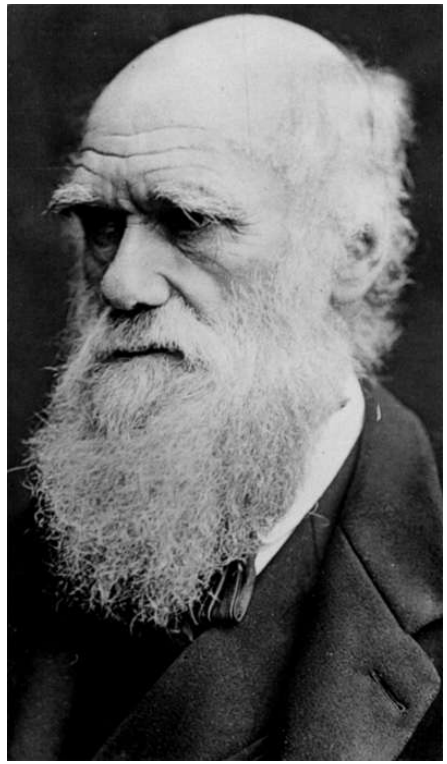
V. Systèmes microfluidiques et évolution dirigée

Concept d'évolution naturelle

Définition : Transformation d'un organisme au cours des générations suite à l'altération du génotype et maintien du phénotype le mieux adapté par sélection naturelle.

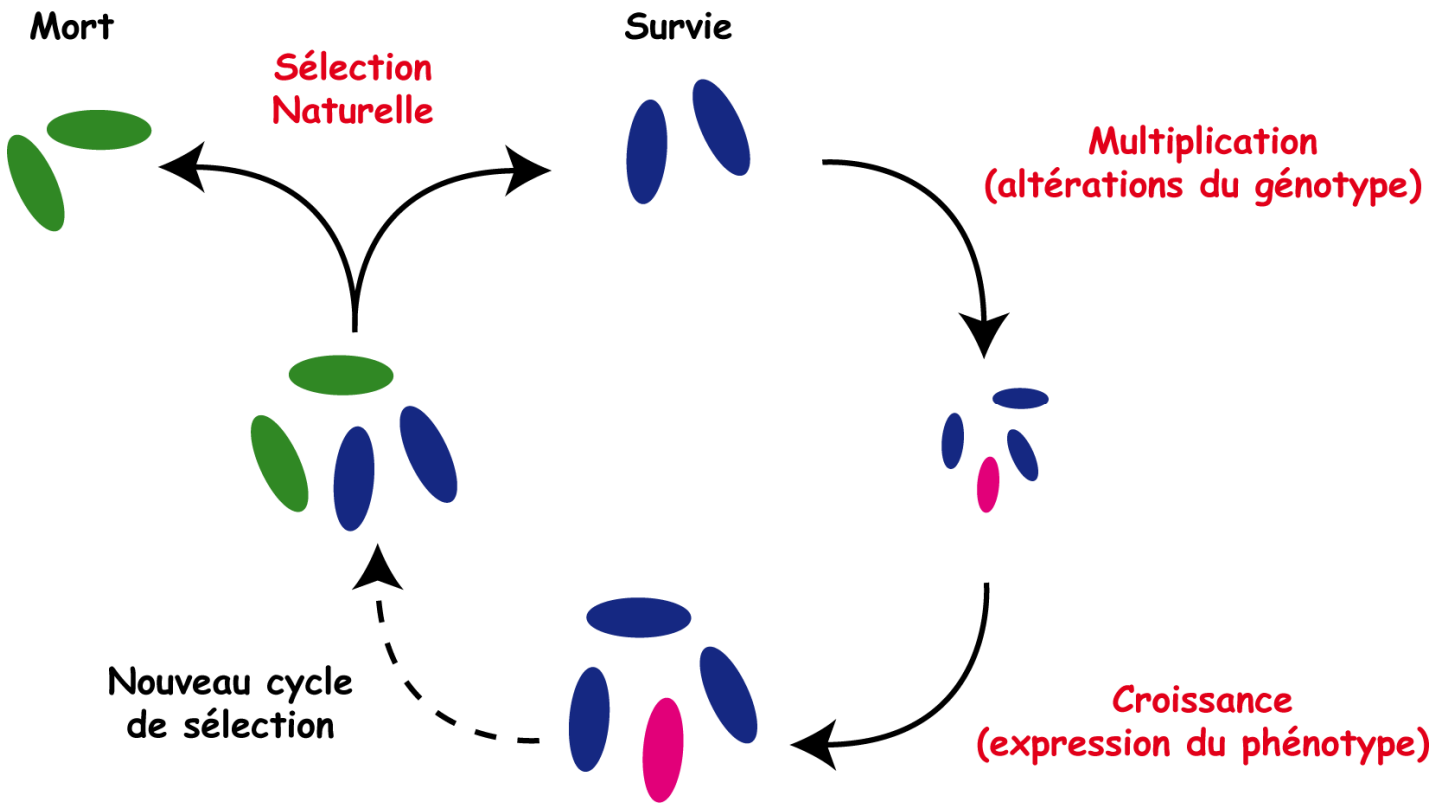
Génotype : support réplicable de l'information génétique (acides nucléiques)

Phénotype : propriété sélectionnable (reconnaissance, activité enzymatique…)



Charles DARWIN (1859)
« L'origine des espèces »

Evolution naturelle suivant le principe darwinien



Lien génotype/phénotype assuré par le compartiment cellulaire

Concept d'évolution dirigée

Définition : Procédé mimant l'évolution naturelle de façon accélérée et visant à améliorer, ou modifier, les propriétés (phénotype) d'une macromolécule (acide nucléique ou protéine) par altération de la séquence de son gène (génotype) et sélection des meilleurs variants.

Synonymes : évolution *in vitro*, évolution en laboratoire/tube à essai

Challenge : maintenir le lien phénotype- génotype

Intérêts de l'évolution dirigée

Recherche appliquée

* Médecine (Ac thérapeutiques, vaccins…)
  (UE « Ingénierie de protéines d'intérêt thérapeutique »)

* Industrie (Biocatalyseurs, lipases, protéases…)

* Environnement (Enzymes de détoxification…)

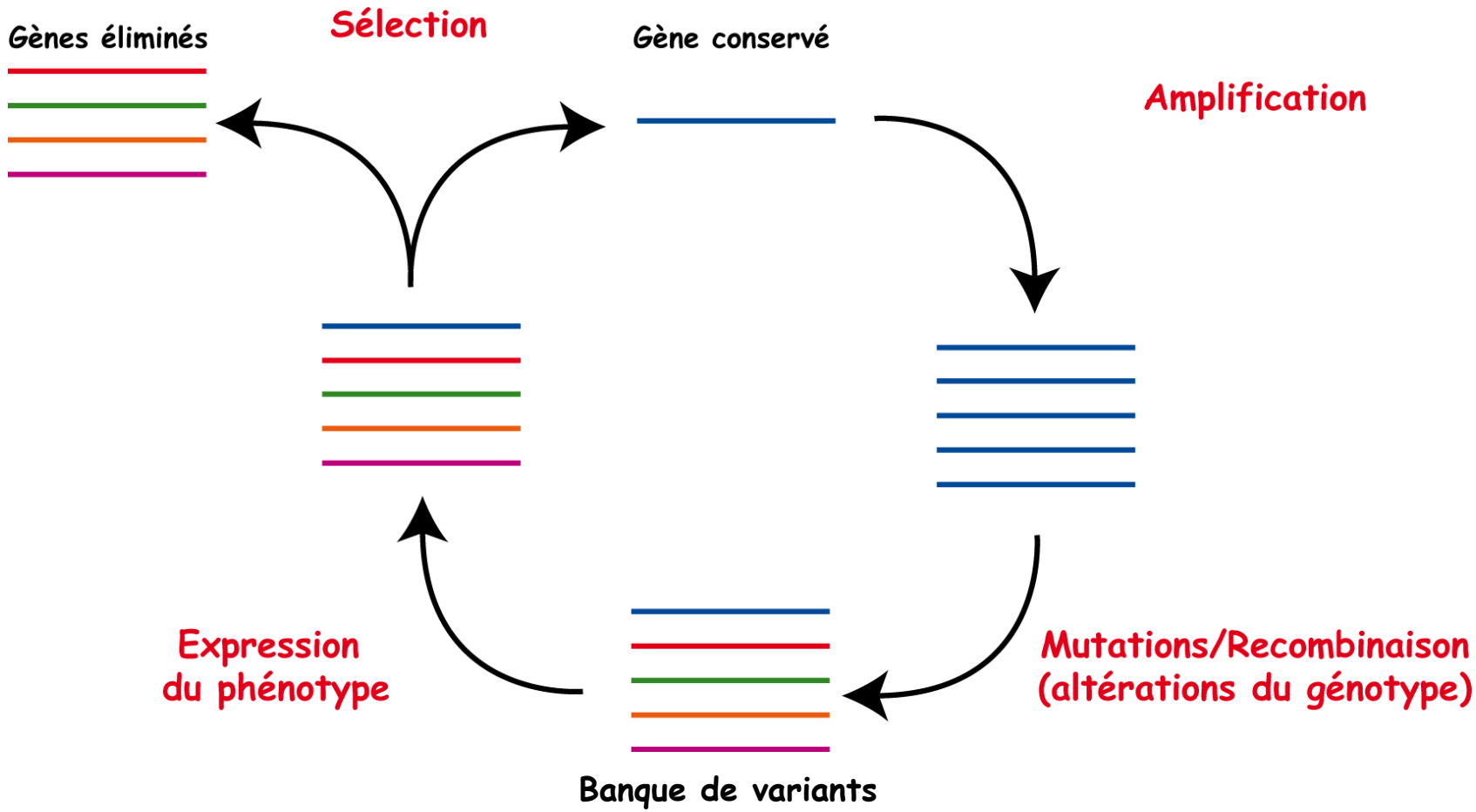
Recherche fondamentale

* caractérisation fonctionnelle de macromolécules

* étude des procédés d'évolution

* étude des origines de la vie

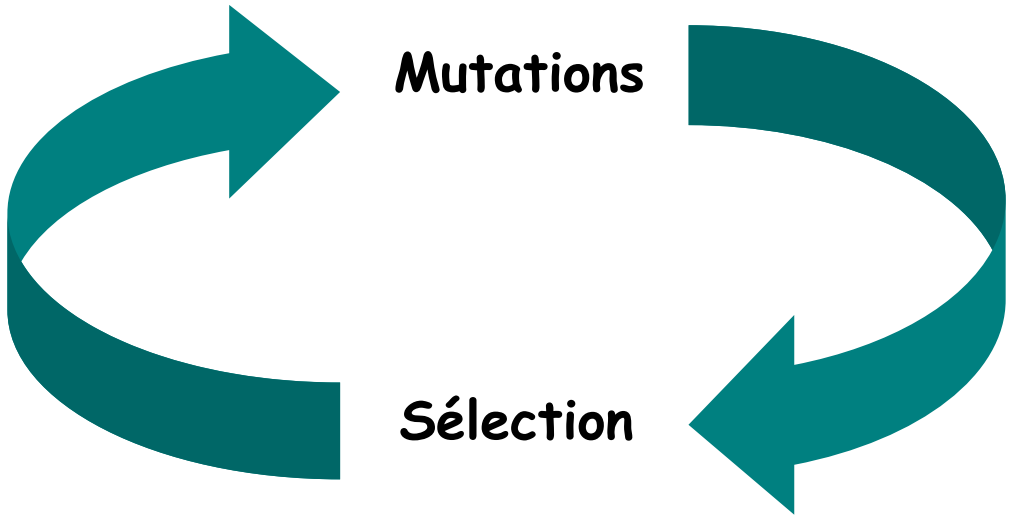
Stratégie d'évolution dirigée en laboratoire



Cycles itératifs de mutation/recombinaison et de sélection

Evolution dirigée en résumé…

Création de diversité génétique



Conservation des plus « adaptés »

Evolution dirigée de macromolécules biologiques

I. Introduction à l'évolution dirigée

II. Création de la diversité génétique

III. Stratégies de sélection en évolution dirigée

IV. Compartimentation *in vitro*

V. Systèmes microfluidiques et évolution dirigée

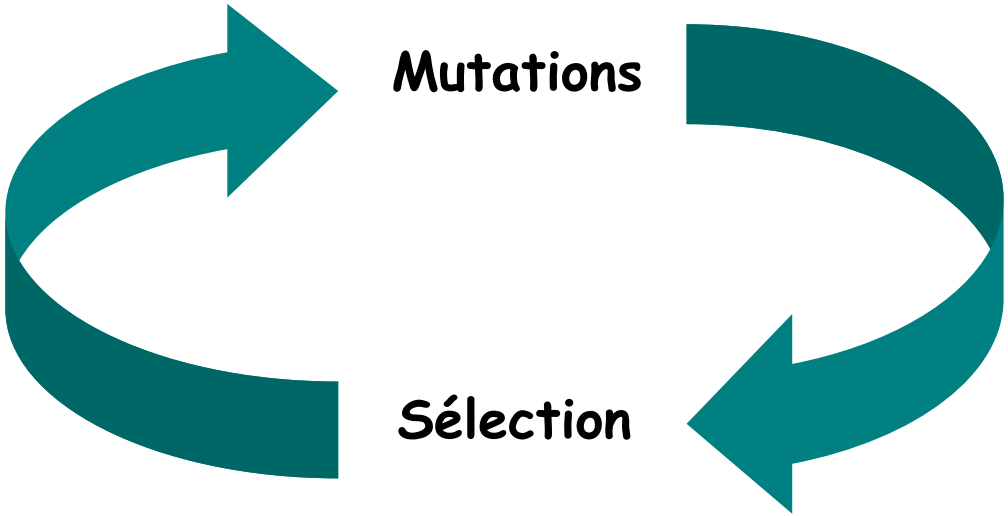
Adapter la diversité au besoin

Banque initiale

Sélection modèle
(2 variants)

Véritable sélection
(10^{7-15} variants)

Création de diversité génétique

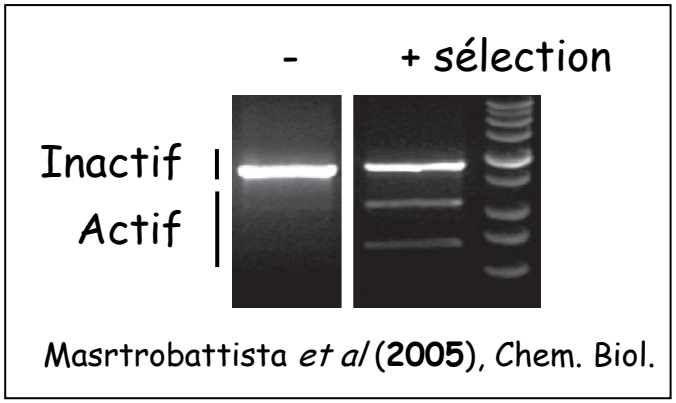


Conservation des plus « adaptés »

Sélection modèle

* Permet de tester le système de sélection

* Système simple à 2 variants (actif/inactif)



Masrtrobattista *et al* (**2005**), Chem. Biol.

* Suivie de l'enrichissement en variant actif : marquage d'un variant par un site de restriction

T	M	Y	T	R	V	P	L	M	N	E
ACC	ATG	TAC	ACC	CGC	GTG	CCG	CTG	ATG	AAT	GAG

T	M	Y	T	R	V	P	L	M	N	E
ACC	ATG	TAC	ACC	CGG	GTA	CCG	CTG	ATG	AAT	GAG

KpnI

* Introduction de mutations silencieuses ou inactivantes

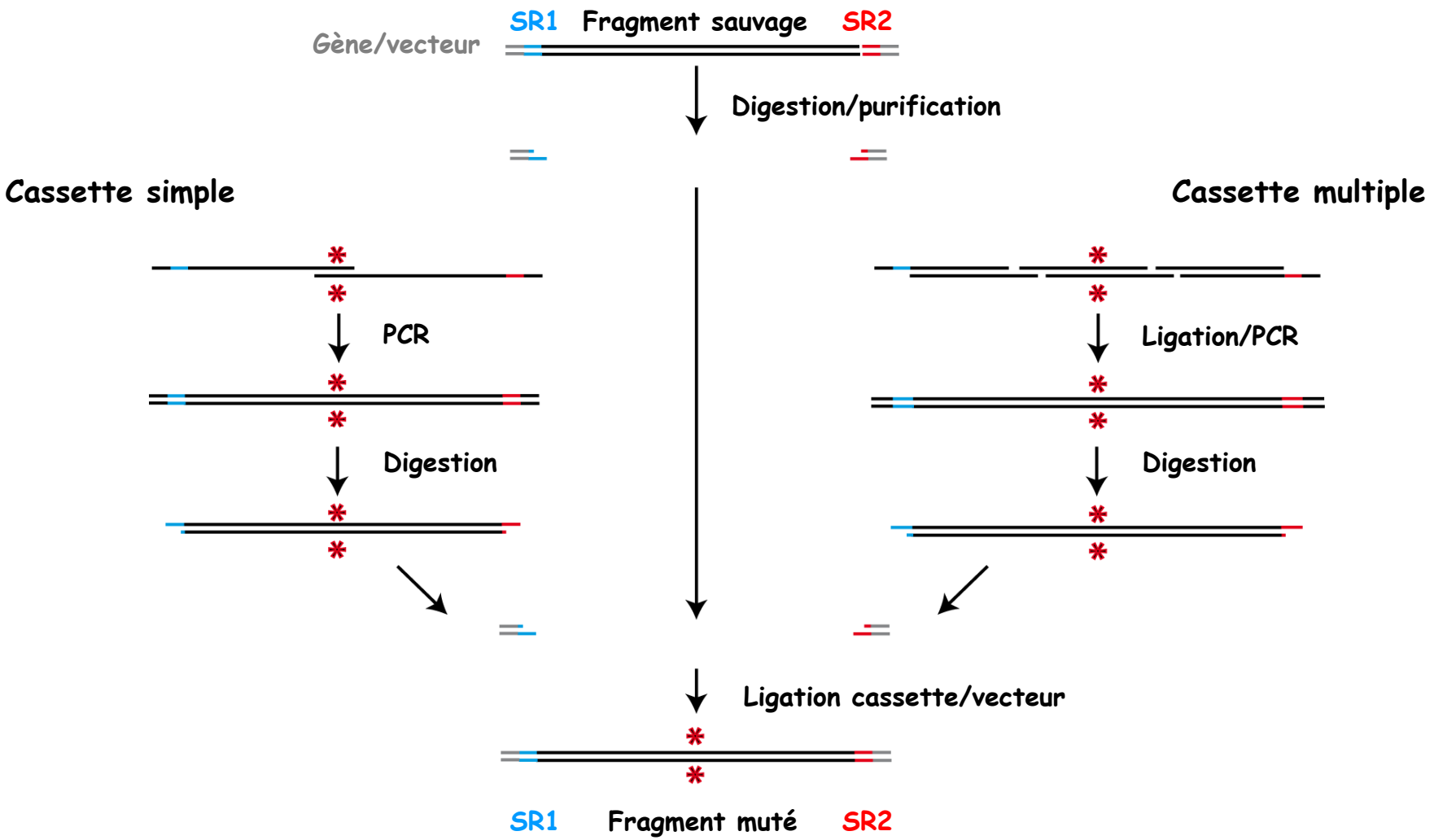
Création de la diversité génétique

Mutagenèse dirigée : * altération de la séquence sur un résidu ou une région définie
* données préalables (séquence, structure…) nécessaires

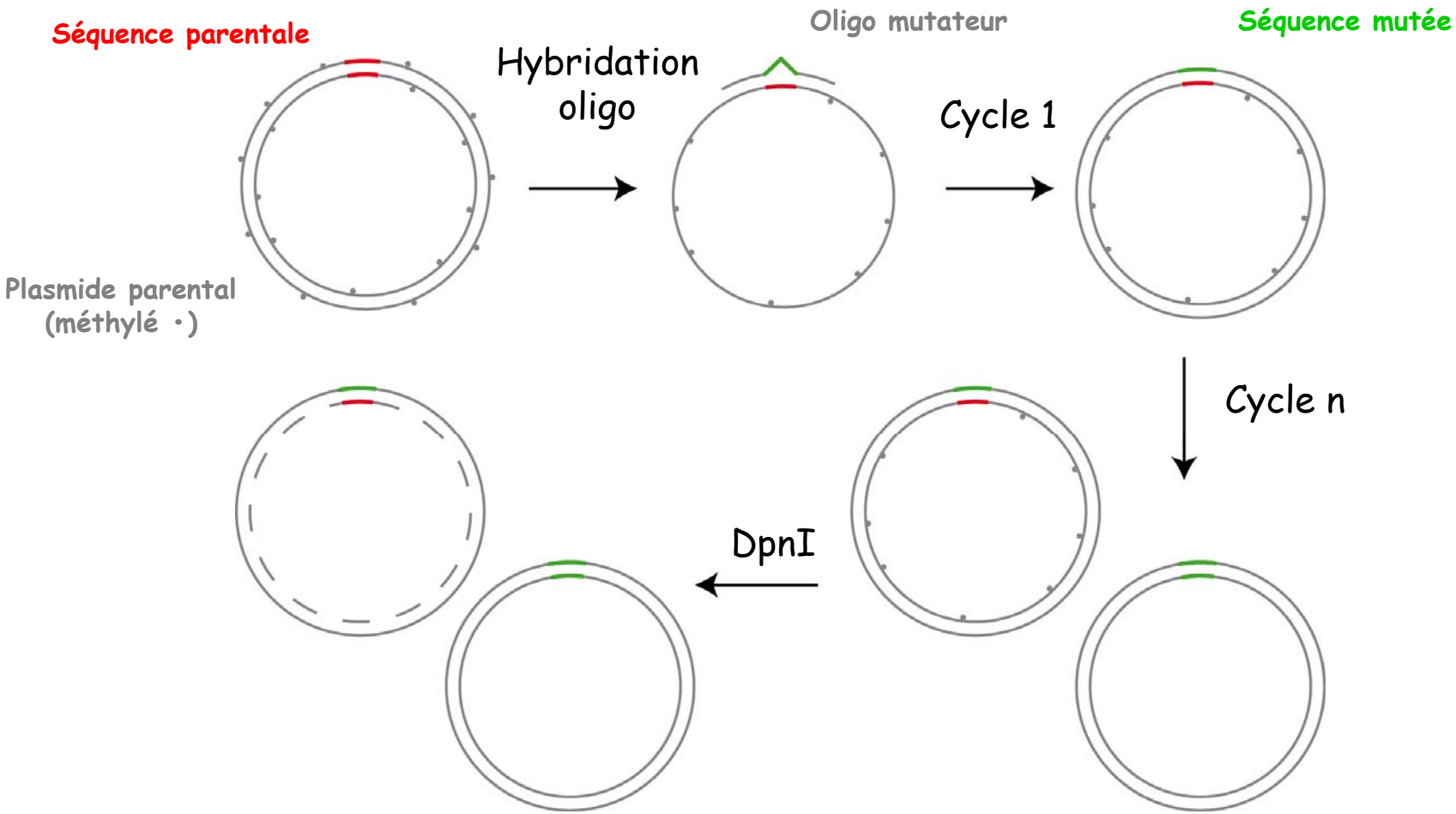
Mutagenèse aléatoire : * altération aléatoire de la séquence
* pas de connaissances du système requises

Recombinaison *in vitro* : * altération aléatoire de la séquence
* mélange de fragments de gènes
* pas de connaissances du système requises

Mutagenèse dirigée par remplacement de cassette



Mutagenèse dirigée par PCR



Système QuickChange (Stratagene)

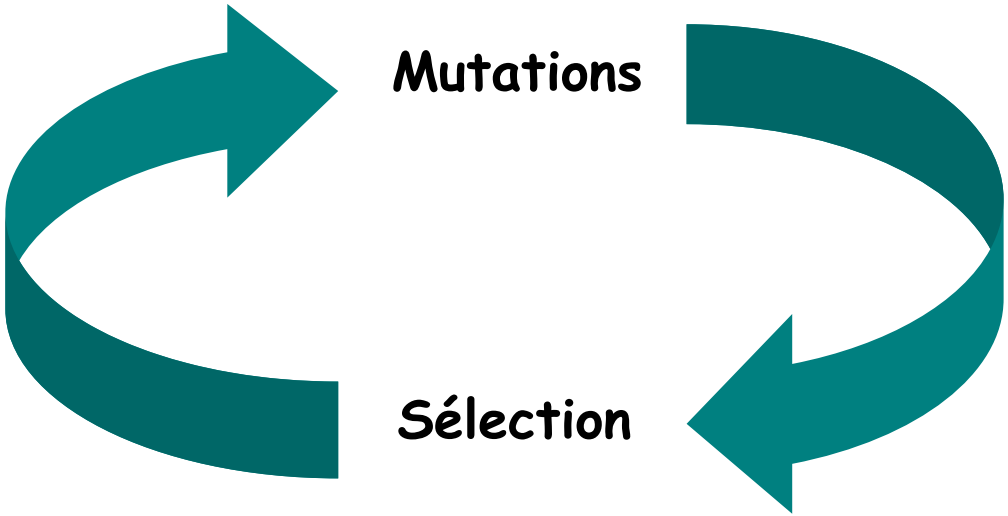
Variabilité de la diversité

Banque initiale

Sélection modèle
(2 variants)

Véritable sélection
(10^{7-15} variants)

Création de diversité génétique



Conservation des plus « adaptés »

Création de la diversité génétique

Mutagenèse dirigée : * altération de la séquence sur un résidu ou une région définie
* données préalables (séquence, structure…) nécessaires

Mutagenèse aléatoire : * altération aléatoire de la séquence
* pas de connaissances du système requises

Recombinaison *in vitro* : * brassage de fragments de gènes
* destiné à l'évolution dirigée de gènes de protéines
* altération aléatoire de la séquence
* pas de connaissances du système requises

Types d'altérations

*** Mutations ponctuelles**

Transitions :	A→G, G→A C→T, T→C	
Transversions :	A→T, T→A G→C, C→G	T→G, G→T A→C, C→A

*** Insertions de nucléotides**

*** Délétions de nucléotides**

Espace de séquences

Espace de séquences : nombre de permutations à réaliser pour obtenir toutes les combinaisons d'une quantité de mutations donnée dans une molécule de taille définie.

ADN/ARN	Protéine
$Vx = \frac{3^x (N \,.\, N\text{-}1 \,\ldots\, N\text{-}x)}{x!}$	$Vx = \frac{19^x (N \,.\, N\text{-}1 \,\ldots\, N\text{-}x)}{x!}$

V : nombre de variants
x : nombre moyen de mutations/molécule
N : taille de la molécule (nt ou aa)

Par exemple, la mutation aléatoire de 3 positions dans un acide nucléique de 50 résidus produit :

$$V_{(x=4)} = \frac{3^3 (50 \,.\, 49 \,.\, 48)}{3!} = 529200 \text{ variants}$$

Espace de séquences à explorer

Mutations/ molécule	Espace de séquence ARN (100 nt)	Espace de séquence protéine (100 aa)
0	1	1
1	300	1900
2	44,500	1,786,950
3	4,365,900	1,109,100,300
100	5.10^{47}	$7,5.10^{127}$

Comment générer une telle variation?

Création de la diversité génétique

Mutagenèse dirigée : * altération de la séquence sur un résidu ou une région définie
* données préalables (séquence, structure…) nécessaires

Mutagenèse aléatoire : * altération aléatoire de la séquence
* pas de connaissances du système requises

Recombinaison *in vitro* : * brassage de fragments de gènes
* destiné à l'évolution dirigée de gènes de protéines
* altération aléatoire de la séquence
* pas de connaissances du système requises

Agents mutagènes

Souche mutagène (ex: XL1-red, Stratagene)

Génotype : *endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* ***mutD5 mutS mutT*** Tn*10* (Tetr)*a*

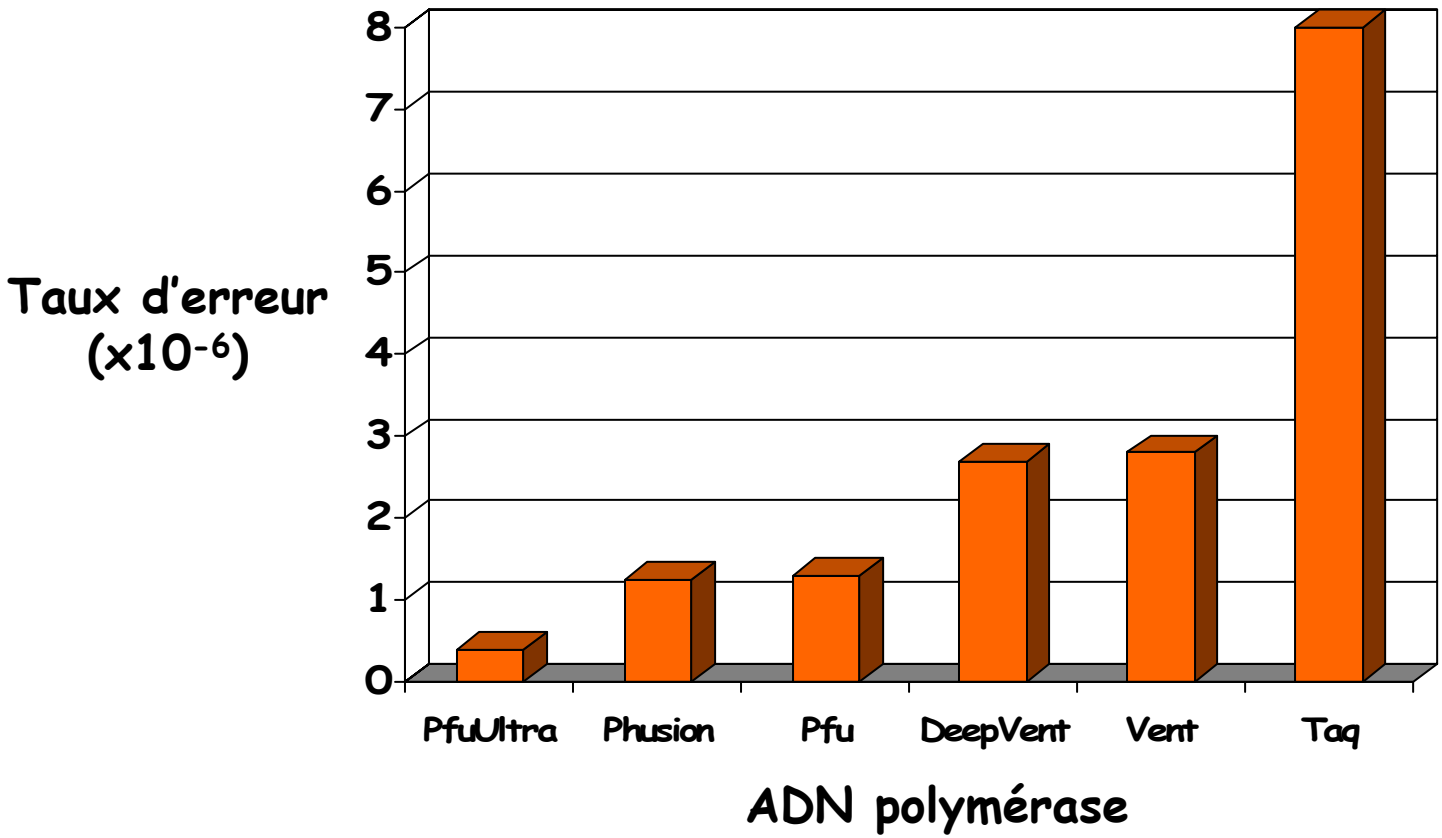
mutD : déficient pour activité 3'-5' exonucléase de l'ADN pol III
mutS : déficient pour la réparation des mismatchs
mutT : déficient pour l'hydrolyse du 8 oxo-GTP

Agents physiques : UV : formation de dimère de thymine

Agents chimiques :
* DiMéthyl Sulfate (DMS) : méthyl N_3A et N_7G
* Méthyl Méthane Sulfonate : méthyl N_3A, N_7G et O_6G
* Acide nitrique : désamination *A*, *C* ($\rightarrow$U), *G*

Approches enzymatiques (PCR)

Fidélité des ADN polymérases



Taq = outil de choix pour l'introduction de mutations (pas de proof-reading)

Réduction de la fidélité de la Taq pol.

Error-prone PCR

Conditions expérimentales :

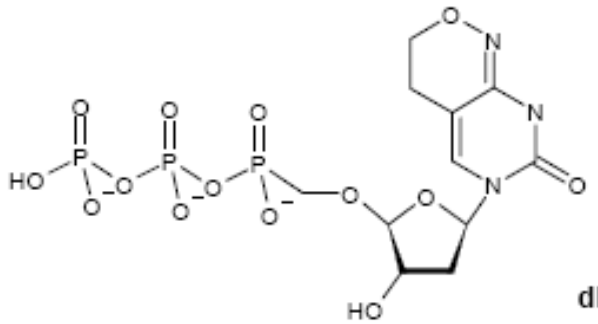
* remplacement du Mg^{2+} par 0,5 mM Mn^{2+}
* [dTTP] = [dCTP] = 1mM
* [dATP] = [dGTP] = 0,2 mM

Taux d'erreur : * soit 5 erreurs/kb (0,5%) après 25 cycles de PCR

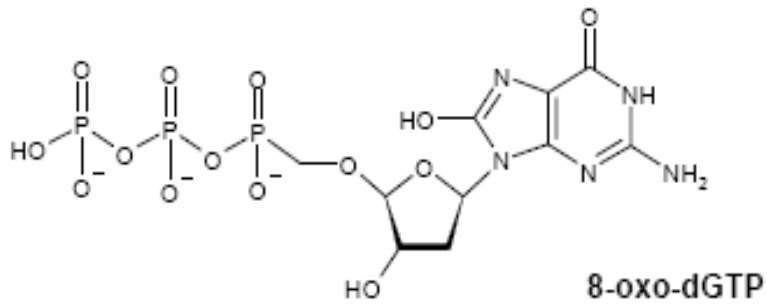
Affinage du taux de mutations :

* variation des concentrations de dNTP et de Mn^{2+}
* variation du nombre de cycles de PCR

Utilisation d'analogues de dNTP



* Misappariement avec *A* et *G*
* Dirige incorporation d'un *G* ou d'un *A*
* *A→G*, *T→C*, *G→A*, *C→T*



* Misappariement avec *A*
* Dirige incorporation d'un *C*
* *A→C*, *T→G*

La combinaison des deux molécules permet d'atteindre <u>20%</u> d'erreur

Affinage du taux de mutation par variation du nombre de cycles de PCR

Biais de la mutagenèse aléatoire par PCR

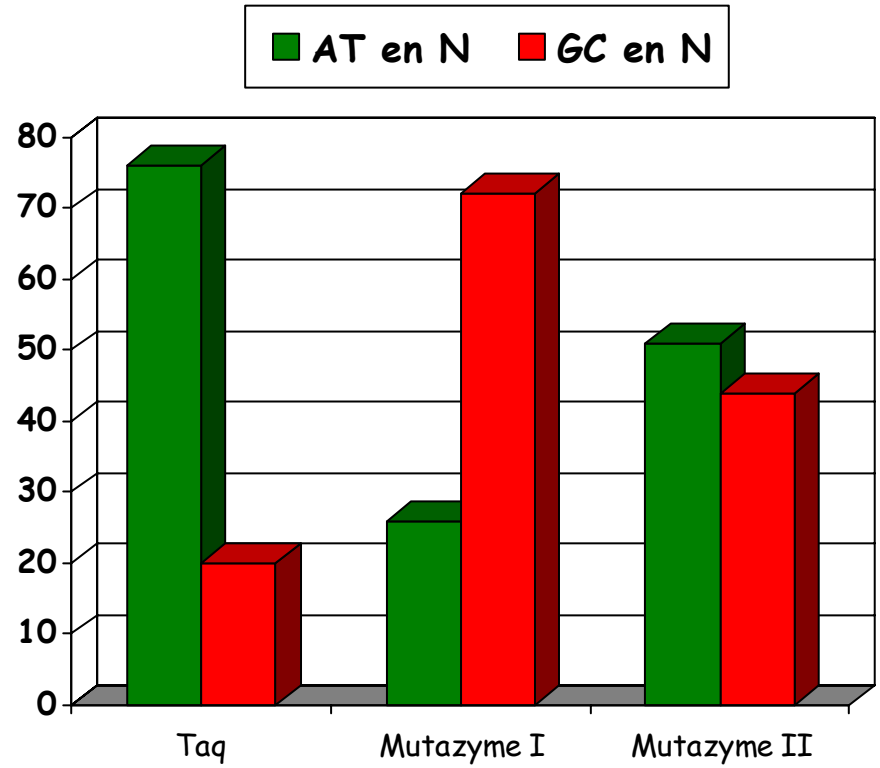
1. Biais d'incorporation : l'enzyme fait préférentiellement certaines erreurs

* Taq et Mutazyme = biais complémentaires

* Combinaison Taq/Mutazyme = Mutazyme II

* Mutazyme II = biais atténué et négligeable

* Affinage du taux de mutations par variation de la concentration de matrice



Biais de la mutagenèse aléatoire par PCR

1. **Biais d'incorporation :** l'enzyme fait préférentiellement certaines erreurs

2. **Biais d'amplification :** une erreur apparaissant dans les premiers cycles de PCR sera surreprésentée

Biais de la mutagenèse aléatoire par PCR

1. **Biais d'incorporation :** l'enzyme fait préférentiellement certaines erreurs

2. **Biais d'amplification :** une erreur apparaissant dans les premiers cycles de PCR sera surreprésentée

3. **Biais de codon :** apparition préférentielle d'aa de codon de séquence proche

Biais de la mutagenèse aléatoire par PCR

1. **Biais d'incorporation :** l'enzyme fait préférentiellement certaines erreurs

2. **Biais d'amplification :** une erreur apparaissant dans les premiers cycles de PCR sera surreprésentée

3. **Biais de codon :**

Ex : codon Val (**GTT**)

	T	C	A	G	
T	TTT (Phe) TTC (Phe) TTA (Leu) TTG (Leu)	TCT (Ser) TCC (Ser) TCA (Ser) TCG (Ser)	TAT (Tyr) TAC (Tyr) TAA (Stop) TAG (Stop)	TGT (Cys) TGC (Cys) TGA (Stop) TGG (Trp)	T C A G
C	CTT (Leu) CTC (Leu) CTA (Leu) CTG (Leu)	CCT (Pro) CCC (Pro) CCA (Pro) CCG (Pro)	CAT (His) CAC (His) CAA (Gln) CAG (Gln)	CGT (Arg) CGC (Arg) CGA (Arg) CGG (Arg)	T C A G
A	ATT (Ile) ATC (Ile) ATA (Ile) ATG (Met)	ACT (Thr) ACC (Thr) ACA (Thr) ACG (Thr)	AAT (Asn) AAC (Asn) AAA (Lys) AAG (Lys)	AGT (Ser) AGC (Ser) AGA (Arg) AGG (Arg)	T C A G
G	**GTT (Val)** GTC (Val) GTA (Val) GTG (Val)	GCT (Ala) GCC (Ala) GCA (Ala) GCG (Ala)	GAT (Asp) GAC (Asp) GAA (Glu) GAG (Glu)	GGT (Gly) GGC (Gly) GGA (Gly) GGG (Gly)	T C A G

Biais de la mutagenèse aléatoire par PCR

1. **Biais d'incorporation** : l'enzyme fait préférentiellement certaines erreurs

2. **Biais d'amplification** : une erreur apparaissant dans les premiers cycles de PCR sera surreprésentée

3. **Biais de codon** :

Ex : codon Val (**GTT**)

1 mutation : 6 aa

	T	C	A	G	
T	**TTT (Phe)** TTC (Phe) TTA (Leu) TTG (Leu)	TCT (Ser) TCC (Ser) TCA (Ser) TCG (Ser)	TAT (Tyr) TAC (Tyr) TAA (Stop) TAG (Stop)	TGT (Cys) TGC (Cys) TGA (Stop) TGG (Trp)	T C A G
C	**CTT (Leu)** CTC (Leu) CTA (Leu) CTG (Leu)	CCT (Pro) CCC (Pro) CCA (Pro) CCG (Pro)	CAT (His) CAC (His) CAA (Gln) CAG (Gln)	CGT (Arg) CGC (Arg) CGA (Arg) CGG (Arg)	T C A G
A	**ATT (Ile)** ATC (Ile) ATA (Ile) ATG (Met)	ACT (Thr) ACC (Thr) ACA (Thr) ACG (Thr)	AAT (Asn) AAC (Asn) AAA (Lys) AAG (Lys)	AGT (Ser) AGC (Ser) AGA (Arg) AGG (Arg)	T C A G
G	**GTT (Val)** GTC (Val) GTA (Val) GTG (Val)	**GCT (Ala)** GCC (Ala) GCA (Ala) GCG (Ala)	**GAT (Asp)** GAC (Asp) GAA (Glu) GAG (Glu)	**GGT (Gly)** GGC (Gly) GGA (Gly) GGG (Gly)	T C A G

Biais de la mutagenèse aléatoire par PCR

1. **Biais d'incorporation** : l'enzyme fait préférentiellement certaines erreurs

2. **Biais d'amplification** : une erreur apparaissant dans les premiers cycles de PCR sera surreprésentée

3. **Biais de codon** :

Ex : codon Val (**GTT**)

1 mutation : 6 aa
2 mutations : 16 aa

	T	C	A	G	
T	**TTT (Phe)** TTC (Phe) TTA (Leu) TTG (Leu)	**TCT (Ser)** TCC (Ser) TCA (Ser) TCG (Ser)	**TAT (Tyr)** TAC (Tyr) TAA (Stop) TAG (Stop)	**TGT (Cys)** TGC (Cys) TGA (Stop) TGG (Trp)	T C A G
C	**CTT (Leu)** CTC (Leu) CTA (Leu) CTG (Leu)	**CCT (Pro)** CCC (Pro) CCA (Pro) CCG (Pro)	**CAT (His)** CAC (His) CAA (Gln) CAG (Gln)	**CGT (Arg)** CGC (Arg) CGA (Arg) CGG (Arg)	T C A G
A	**ATT (Ile)** ATC (Ile) ATA (Ile) **ATG (Met)**	**ACT (Thr)** ACC (Thr) ACA (Thr) ACG (Thr)	**AAT (Asn)** AAC (Asn) AAA (Lys) AAG (Lys)	**AGT (Ser)** AGC (Ser) AGA (Arg) AGG (Arg)	T C A G
G	**GTT (Val)** GTC (Val) GTA (Val) GTG (Val)	**GCT (Ala)** GCC (Ala) GCA (Ala) GCG (Ala)	**GAT (Asp)** GAC (Asp) **GAA (Glu)** **GAG (Glu)**	**GGT (Gly)** GGC (Gly) GGA (Gly) GGG (Gly)	T C A G

Biais de la mutagenèse aléatoire par PCR

1. **Biais d'incorporation :** l'enzyme fait préférentiellement certaines erreurs

2. **Biais d'amplification :** une erreur apparaissant dans les premiers cycles de PCR sera surreprésentée

3. **Biais de codon :**

Ex : codon Val (**GTT**)

1 mutation : 6 aa
2 mutations : 16 aa
3 mutations : 19 aa

	T	C	A	G	
T	**TTT (Phe)** TTC (Phe) TTA (Leu) TTG (Leu)	**TCT (Ser)** TCC (Ser) TCA (Ser) TCG (Ser)	**TAT (Tyr)** TAC (Tyr) **TAA (Stop)** **TAG (Stop)**	**TGT (Cys)** TGC (Cys) **TGA (Stop)** **TGG (Trp)**	T C A G
C	**CTT (Leu)** CTC (Leu) CTA (Leu) CTG (Leu)	**CCT (Pro)** CCC (Pro) CCA (Pro) CCG (Pro)	**CAT (His)** CAC (His) **CAA (Gln)** **CAG (Gln)**	**CGT (Arg)** CGC (Arg) CGA (Arg) CGG (Arg)	T C A G
A	**ATT (Ile)** ATC (Ile) ATA (Ile) **ATG (Met)**	**ACT (Thr)** ACC (Thr) ACA (Thr) ACG (Thr)	**AAT (Asn)** AAC (Asn) **AAA (Lys)** **AAG (Lys)**	**AGT (Ser)** AGC (Ser) AGA (Arg) AGG (Arg)	T C A G
G	**GTT (Val)** GTC (Val) GTA (Val) GTG (Val)	**GCT (Ala)** GCC (Ala) GCA (Ala) GCG (Ala)	**GAT (Asp)** GAC (Asp) **GAA (Glu)** **GAG (Glu)**	**GGT (Gly)** GGC (Gly) GGA (Gly) GGG (Gly)	T C A G

Création de la diversité génétique

Mutagenèse aléatoire : * altération aléatoire de la séquence
* pas de connaissances du système requises

Mutagenèse dirigée : * altération de la séquence sur un résidu ou une région définie
* données préalables (séquence, structure…) nécessaires

Recombinaison *in vitro* : * brassage de fragments de gènes
* destiné à l'évolution dirigée de gènes de protéines
* altération aléatoire de la séquence
* pas de connaissances du système requises

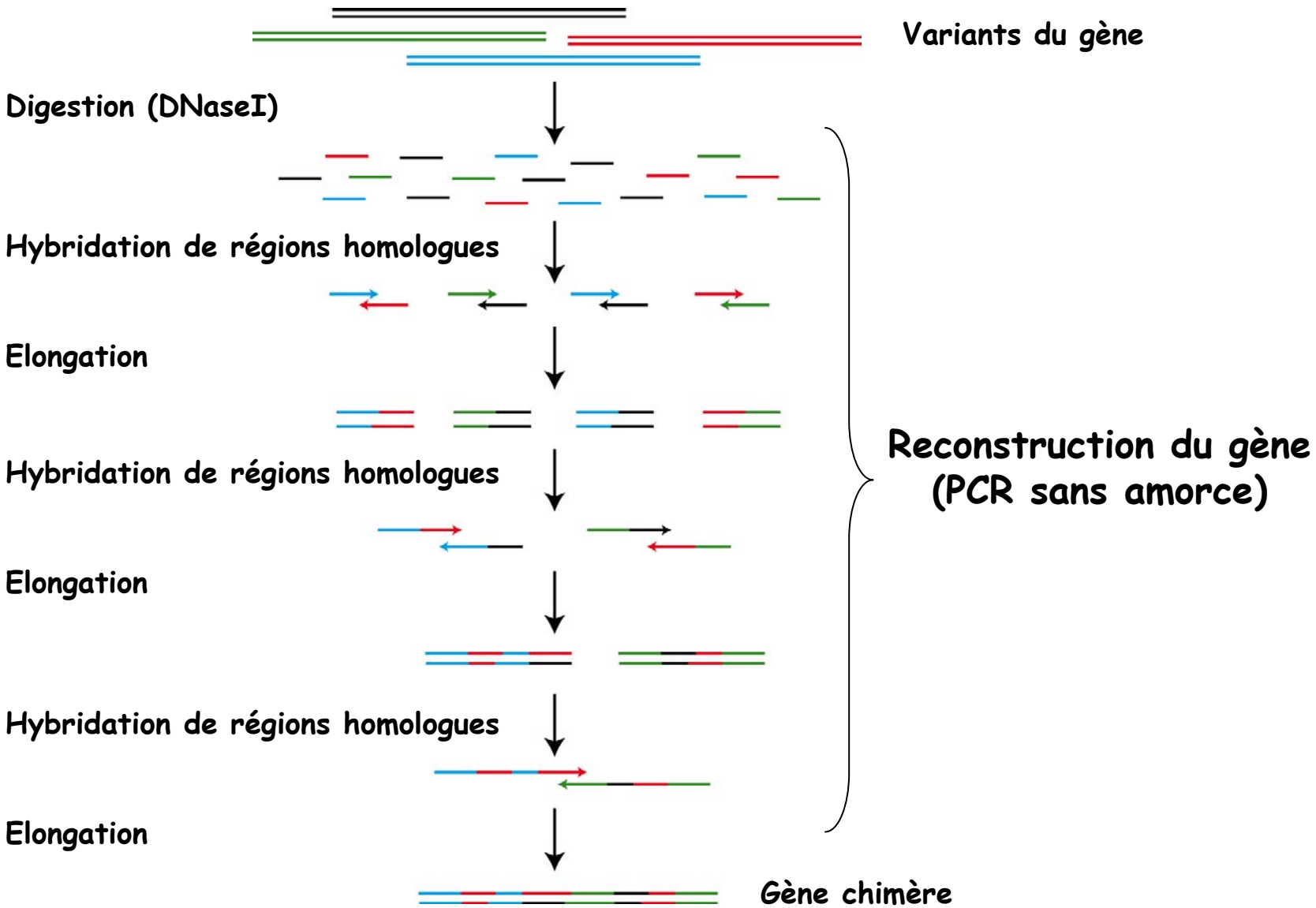
Recombinaison *in vitro*

Objectif : Brasser le contenu des gènes pour conserver les mutations favorables et éliminer les mutations neutres ou délétères.

Principales approches :

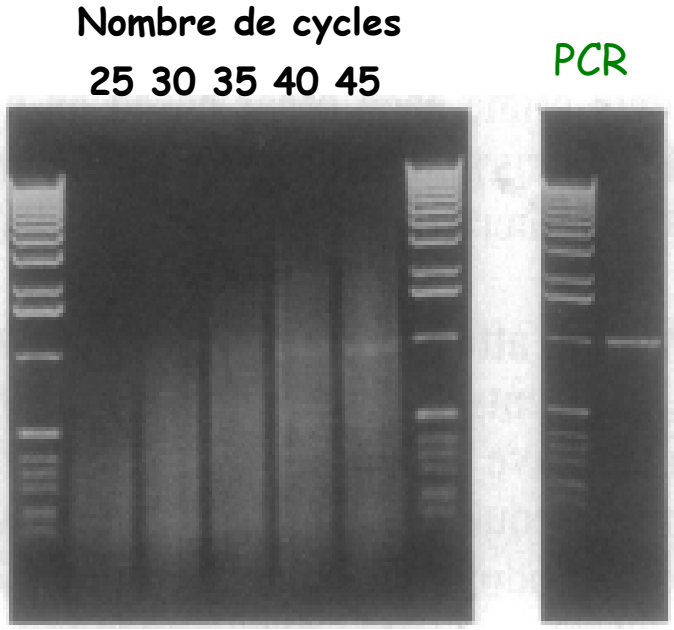
- DNA shuffling (recombinaison homologue)
- StEP (recombinaison homologue)
- RaChiTT (recombinaison homologue)
- ITCHY (recombinaison hétérologue)

Recombinaison « homologue » DNA shuffling

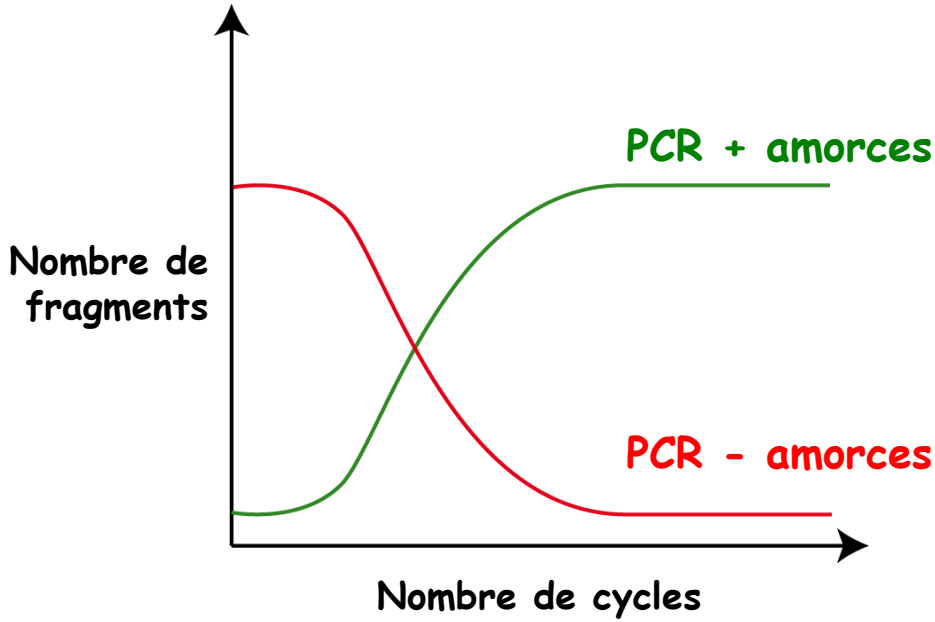


DNA shuffling : reconstruction du gène

Reconstruction



Stemmer (**1994**), PNAS



Diversité générable par PCR de reconstruction avec Taq

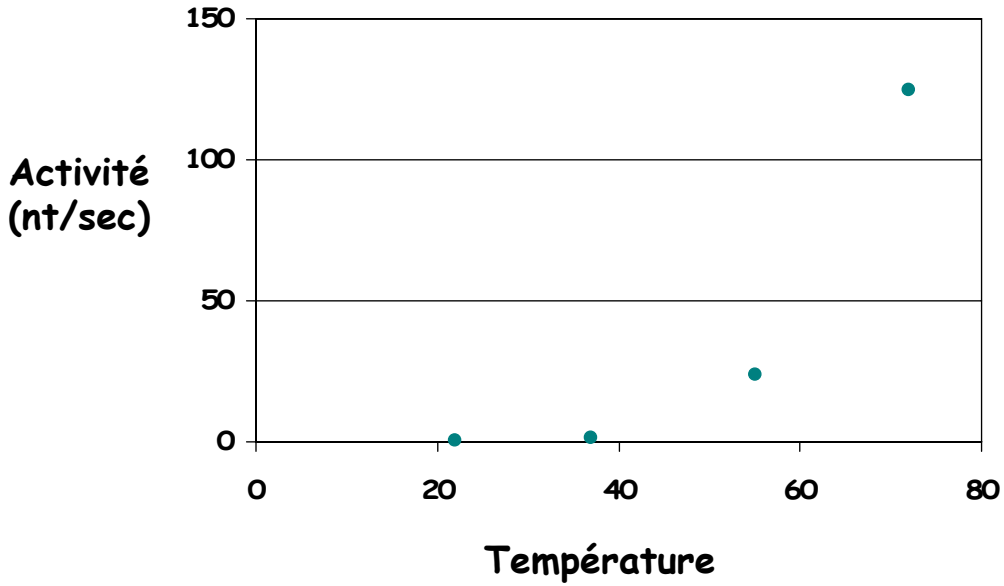
Recombinaison « homologue » par StEP

* **StEP** = **St**aggered **E**xtension **P**rocess (Zhao *et al* (**1998**) Nature Biotech.)

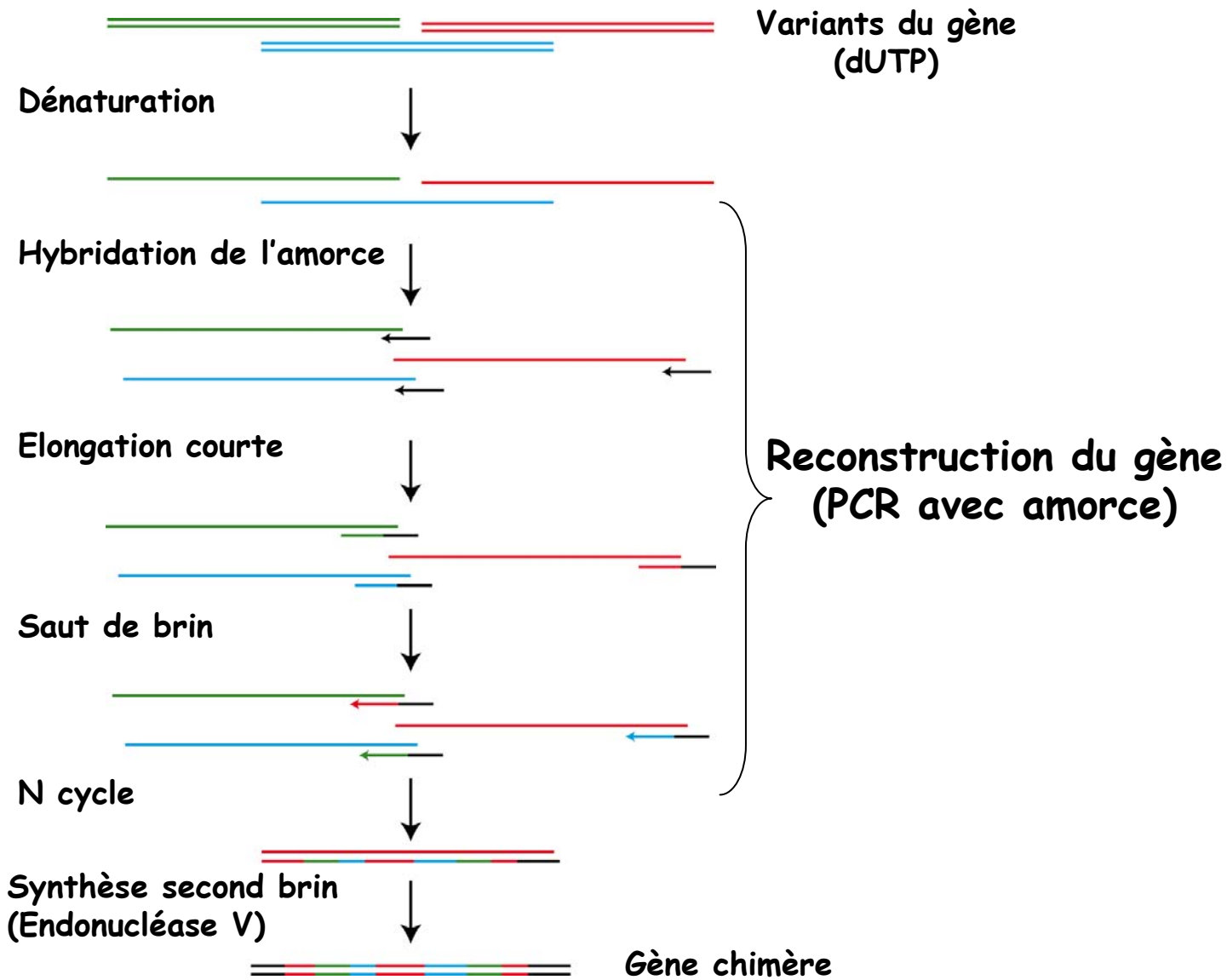
* Construction de gènes chimères par PCR

* Temps d'élongation courts (quelques secondes)

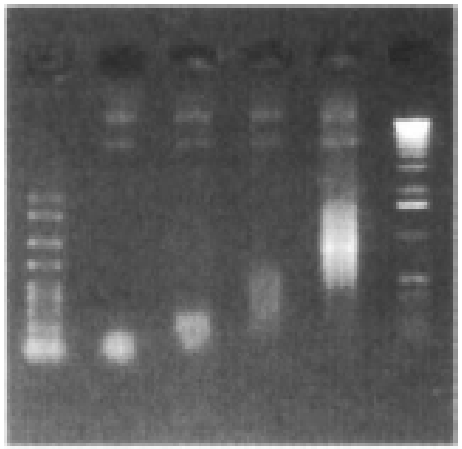
* Réduction de la température d'élongation



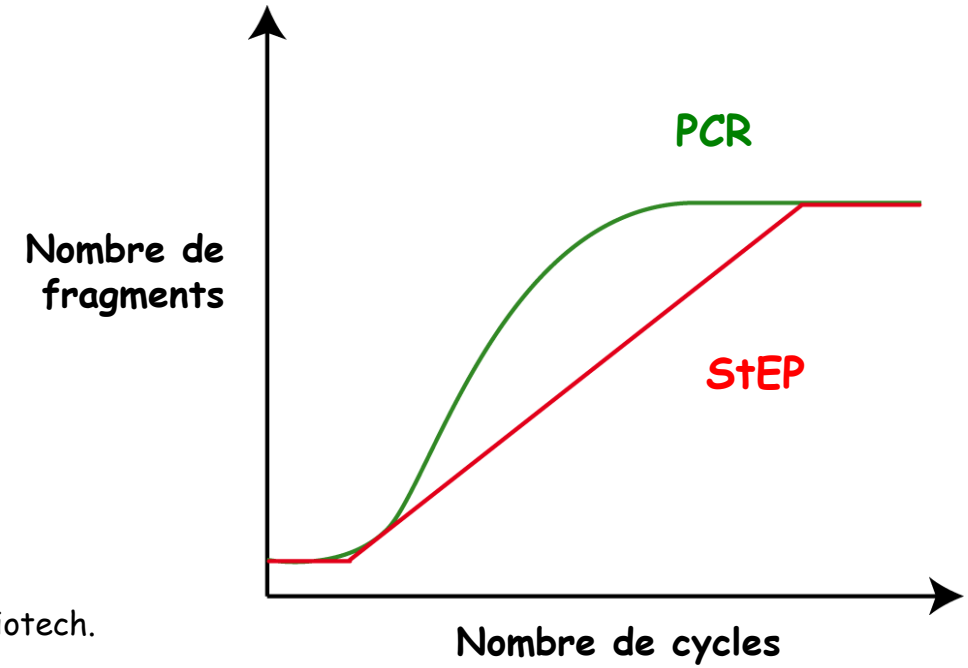
Recombinaison « homologue » par StEP



StEP : reconstruction du gène



Zoa *et al* (**1998**), Nat. Biotech.



Diversité générable durant la reconstruction en utilisant la Taq

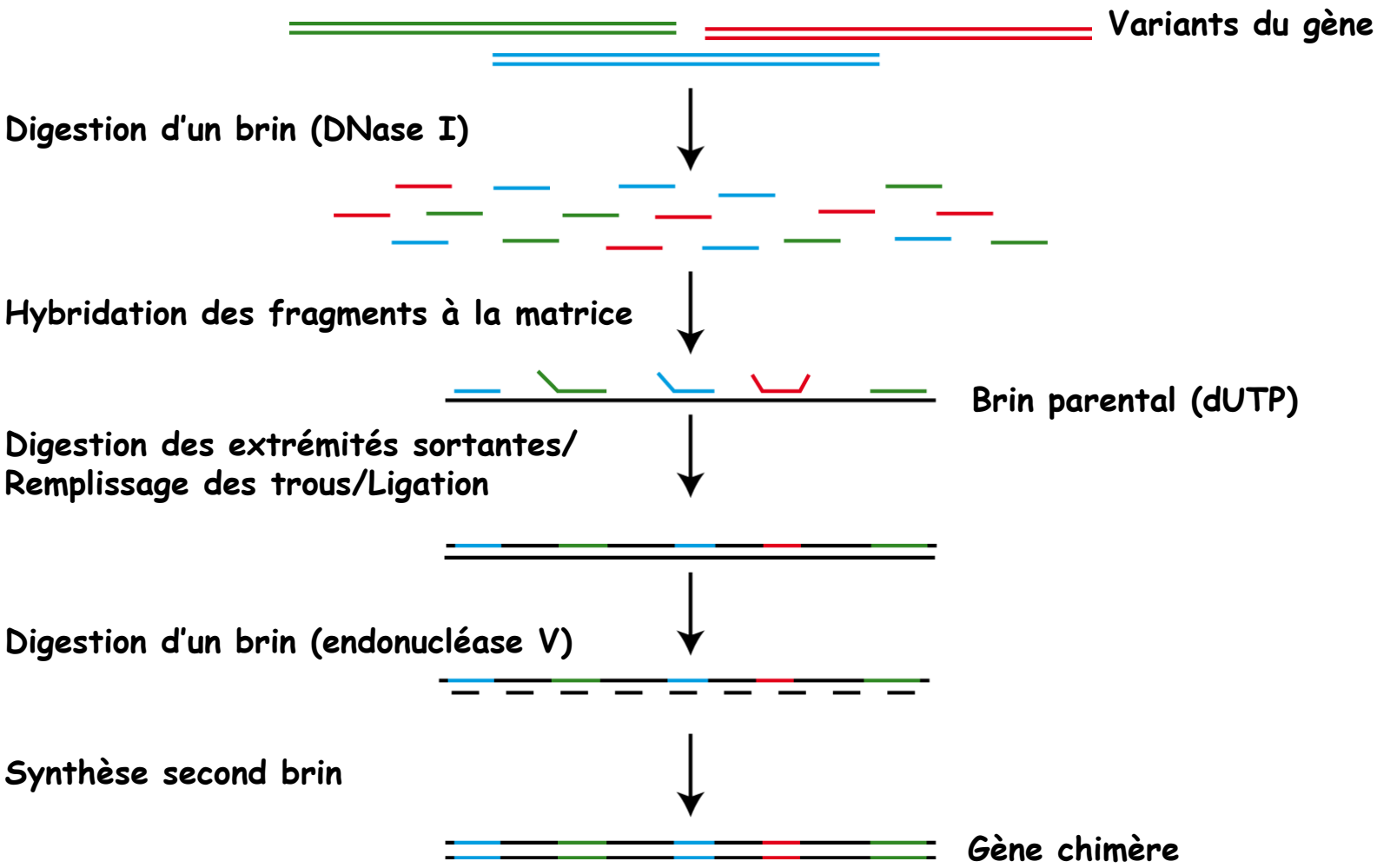
Recombinaison « homologue » par RaChiTT

* **RaChiTT** = **Ra**ndom **Chi**meragenesis on **T**ransient **T**emplates
(Coco *et al* (**2001**) Nature Biotech.)

* Hybridation dirigée de fragments sur un brin parental matrice

* Génère plus de recombinaison (14 c.o) que StEP et shuffling (1-4 c.o)

Recombinaison « homologue » par RaChiTT



Recombinaison « hétérologue » par ITCHY

* **ITCHY** = **I**ncremental **T**runcation for **C**reation of **HY**bryid enzyme (Lutz *et al* (**2001**) NAR.)

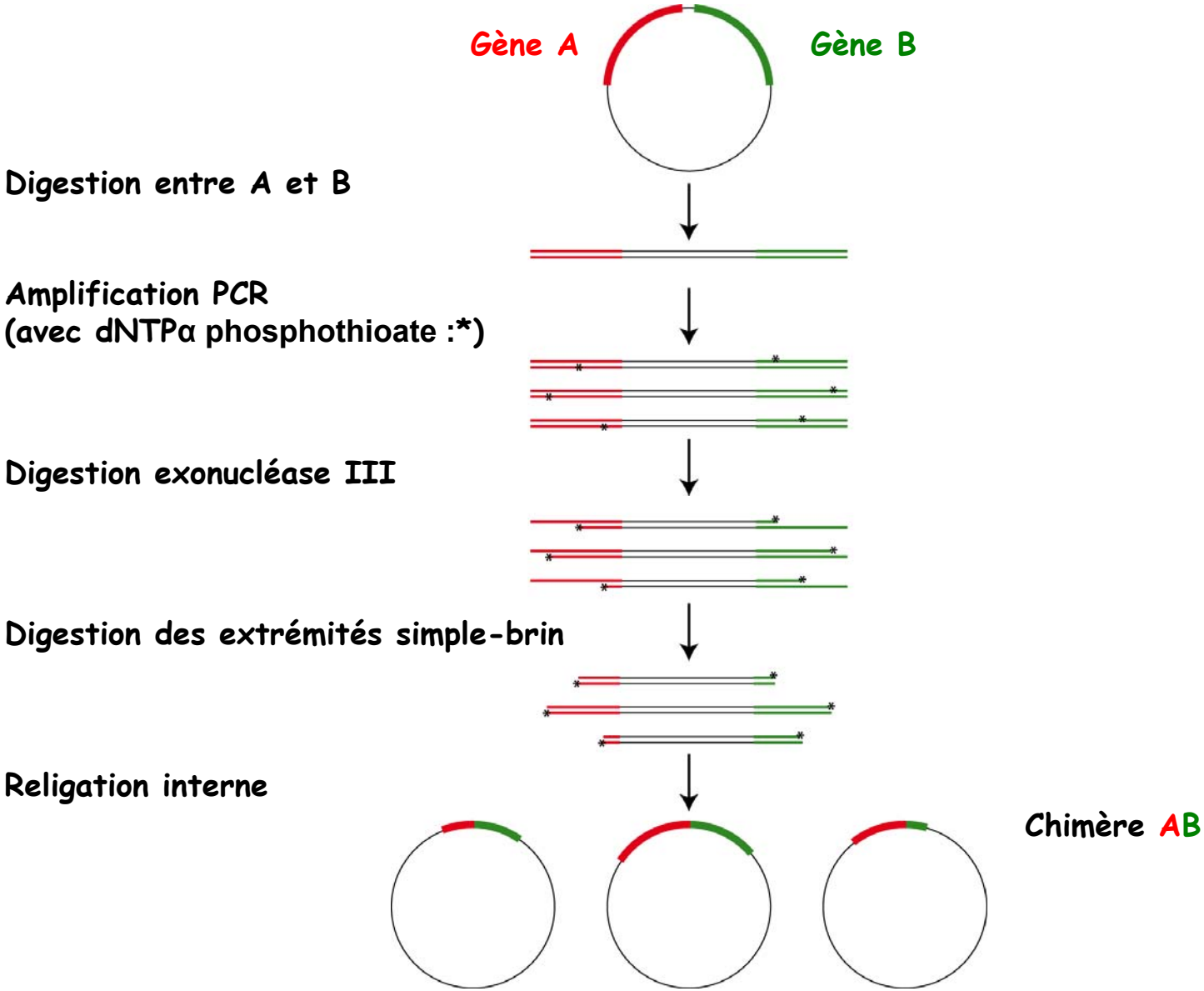
* Recombinaison de gènes avec faible homologie de séquence

* Fusion de deux gènes en tandem après digestion partielle

* 1 seul événement de recombinaison par paire de gènes

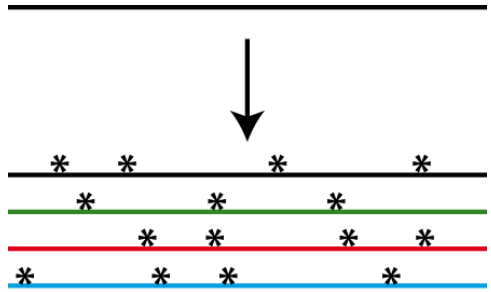
* Peut être suivi par une étape de shuffling (Scratchy)

Recombinaison « hétérologue » par ITCHY

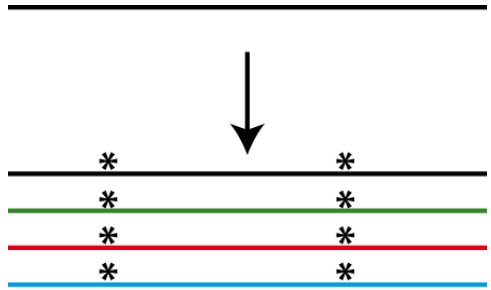


Création de la diversité génétique : bilan

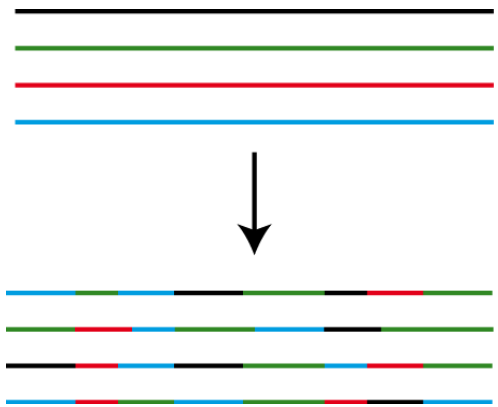
Mutagenèse aléatoire :



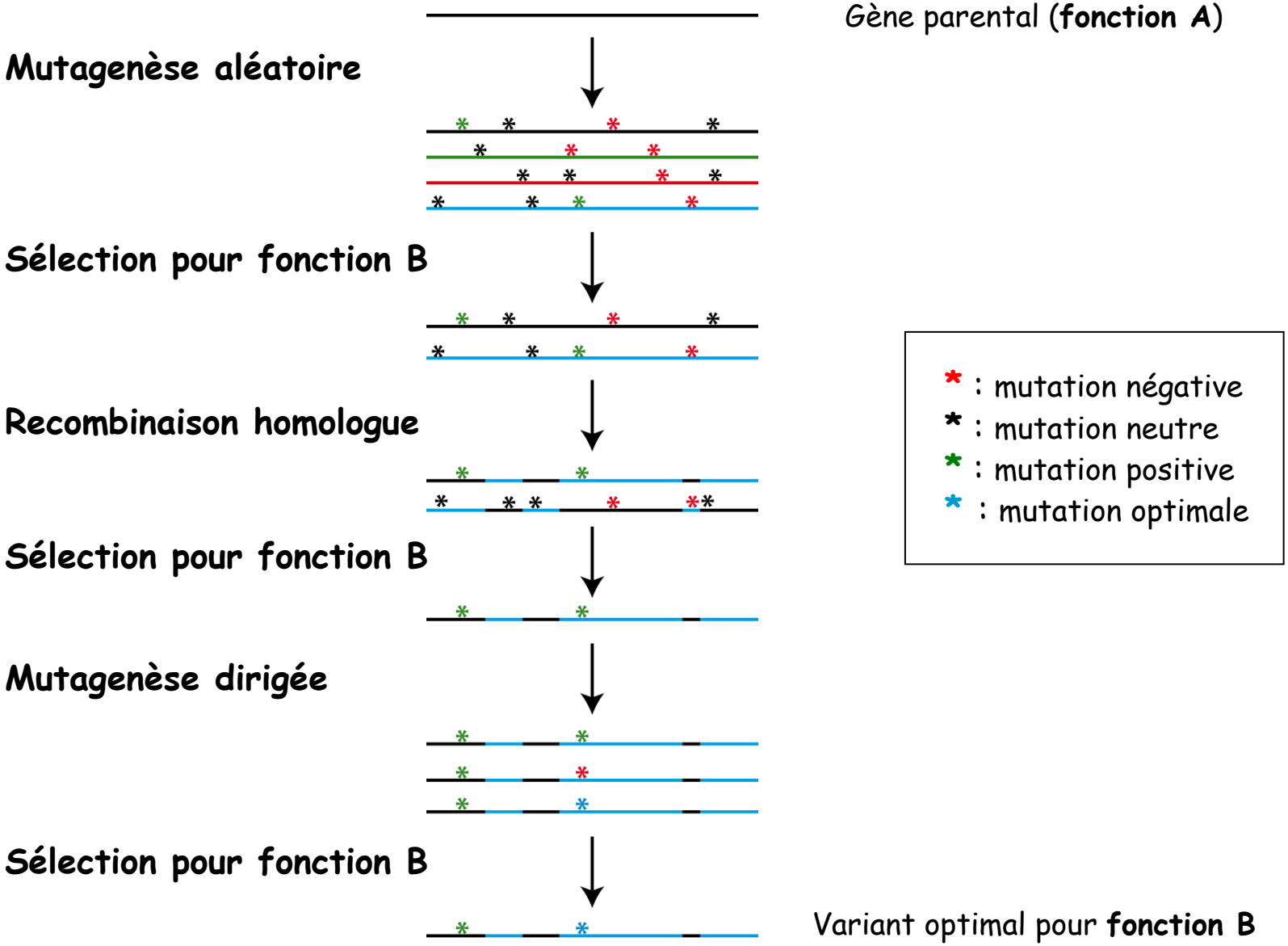
Mutagenèse dirigée :



Recombinaison *in vitro* :



Combinaison des méthodes de mutagenèse/recombinaison



III. Stratégies de sélection en évolution dirigée

1. Aspects généraux
2. Sélection d'acides nucléiques
3. Sélection de protéines

Concept de sélection

* **Sélection au sens strict** : les meilleures molécules sont directement extraites de la population de départ

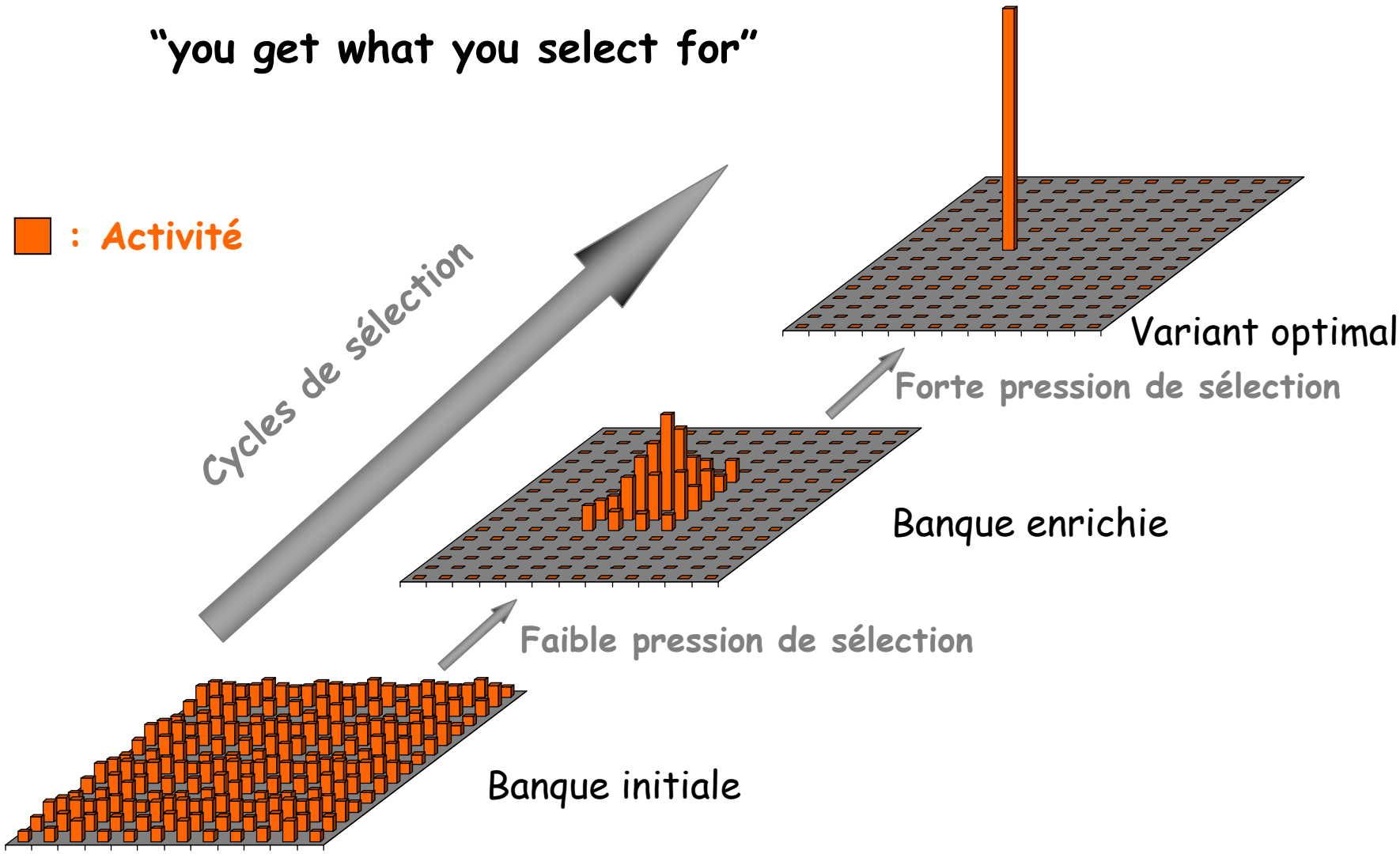
* **Criblage** : chaque variant est analysé et les meilleurs sont conservés

* **Point critique** : conserver le lien entre phénotype et génotype

Objet de la sélection	Lien Phéno/Géno
Cellule	Compartiment cellulaire
Acide nucléique (a.n.)	Acide nucléique
Protéine	Virus (Phage Display)
	Couplage au ribosome (Ribosome display)
	Gouttelettes d'eau dans l'huile (IVC)

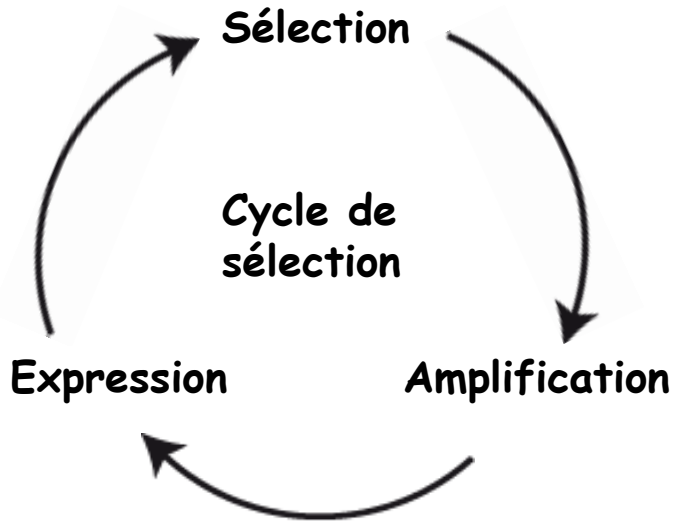
Objectif de la sélection

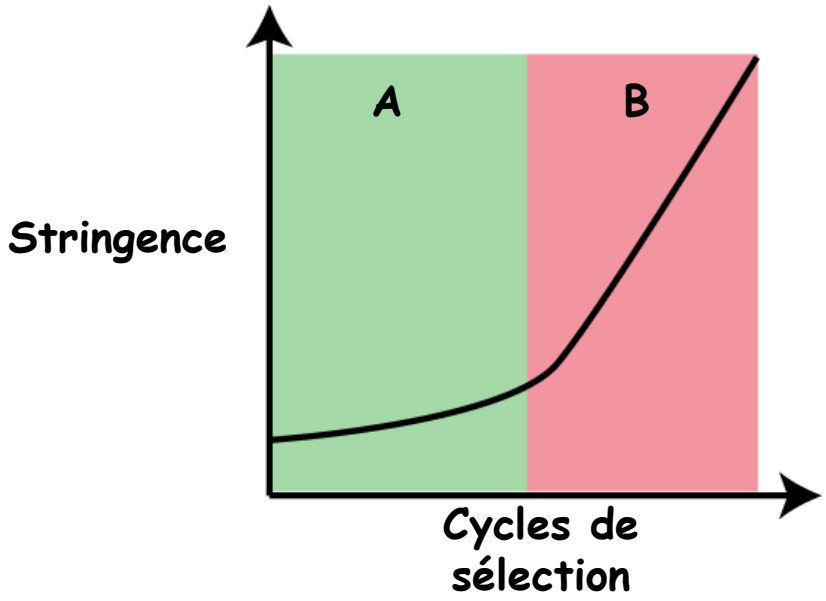
"you get what you select for"



Principe général des stratégies de sélection

* **Principe commun** : cycles itératifs de sélection en stringence croissante (temps, concentration de cible, activité…)





* Premiers cycles (**A**) : - sélection de tout variant actif
  - peu de perte de diversité de séquence active

* Derniers cycles (**B**) : - sélection des variants les plus actifs (compétition)
  - convergence des séquences et enrichissement

III. Stratégies de sélection en évolution dirigée

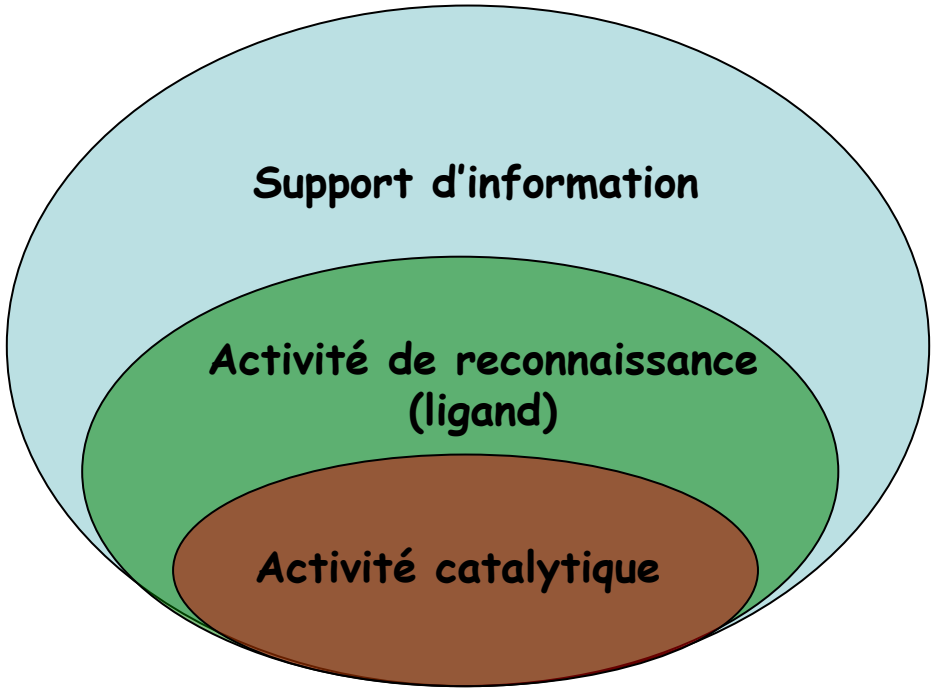
1. Aspects généraux
2. **Sélection d'acides nucléiques**
3. Sélection de protéines

Evolution dirigée d'acides nucléiques

* Format le plus simple car acide nucléique = phénotype + génotype

* Acides nucléiques simple brin (ADNsb ou ARN) de petite taille (20-80 nt)

* Exploite la plasticité structurale et fonctionnelle des acides nucléiques



Acides nucléiques catalytiques

* **Ribozymes** = **Ribo**nucleic + en**zyme**

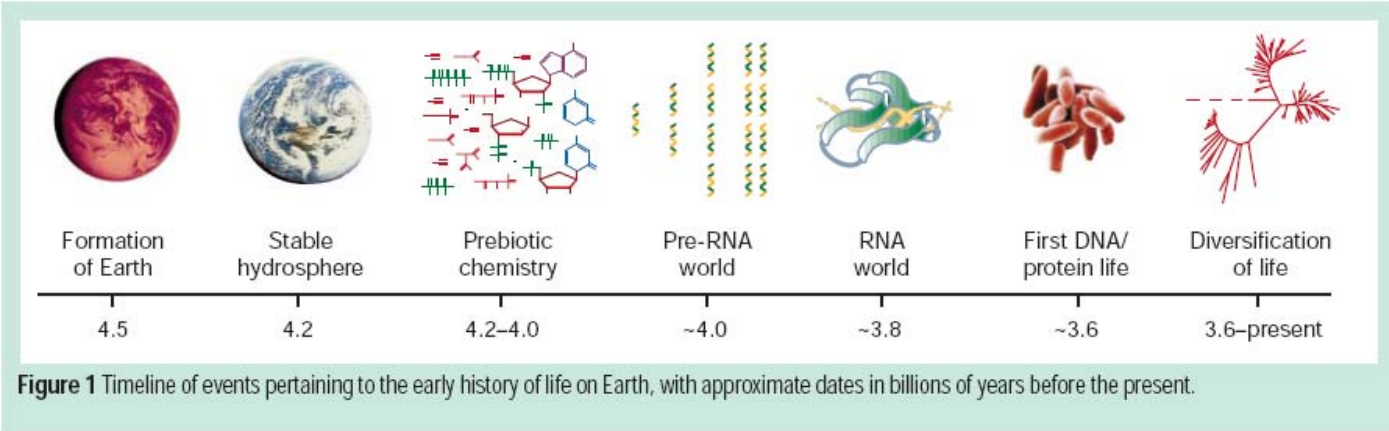


Figure 1 Timeline of events pertaining to the early history of life on Earth, with approximate dates in billions of years before the present.

Joyce (**2002**), Nature

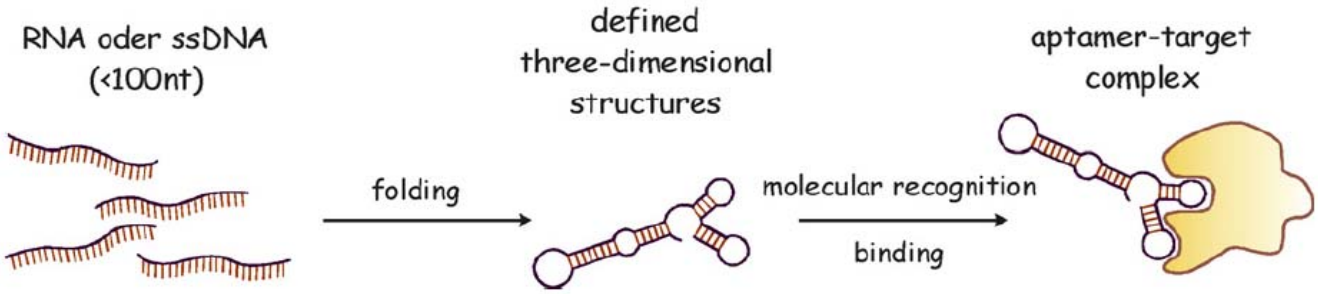
* **Ribozymes naturels : introns autocatalytiques, ribosome, RNaseP**

* **Evoluer de nouveaux ribozymes pour remonter aux origines de la vie (ARN ligase, ARN polymérase, peptidyl transférase, RNase, ADH, Diels alderase…)**

* **Evoluer de nouveaux ribozymes dans un but biotechnologique pour la production de peptides cycliques/modifiés (aminoacyl-transférase-U.E. DRBM)**

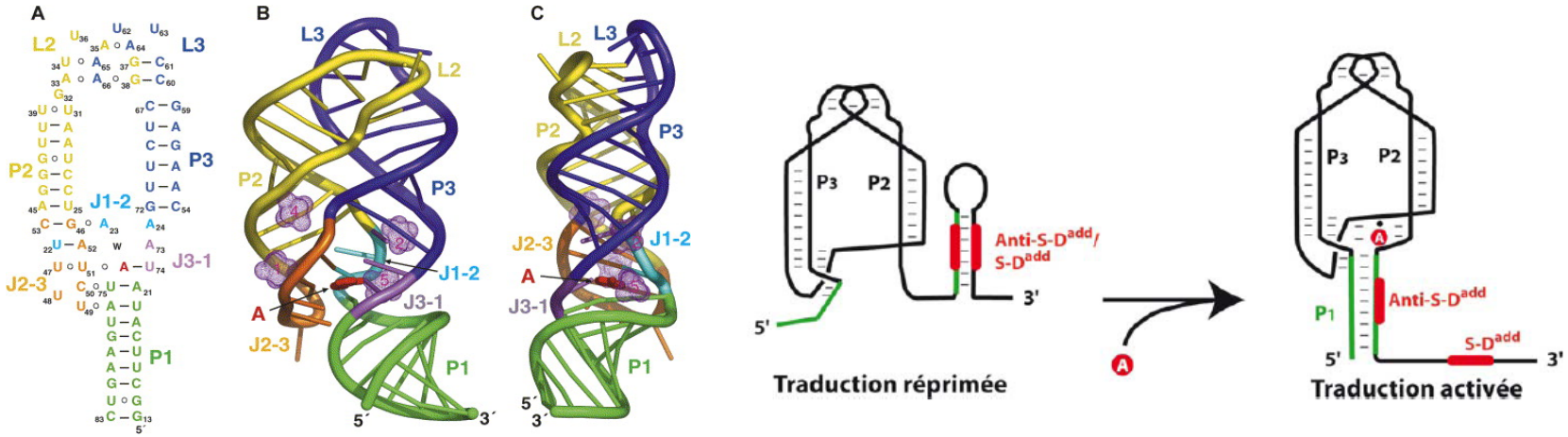
Acides nucléiques ligands

* **Ligands = Aptamers** (aptus = adéquat, emboîtement + meros = particule)



D'après Stoltenburg *et al* (**2007**), Biomol. Eng

* **Aptamer naturels retrouvés dans les riboswitchs (régulation de l'expression des gènes)**



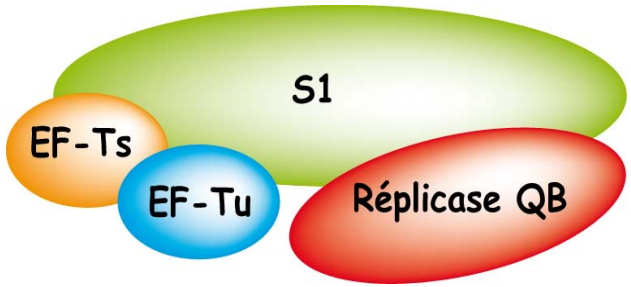
* **Organisation structurale confère une interaction forte avec une cible (~Ag/Ac)**

* **Facile à évoluer, à produire et à modifier en comparaison aux Ac**

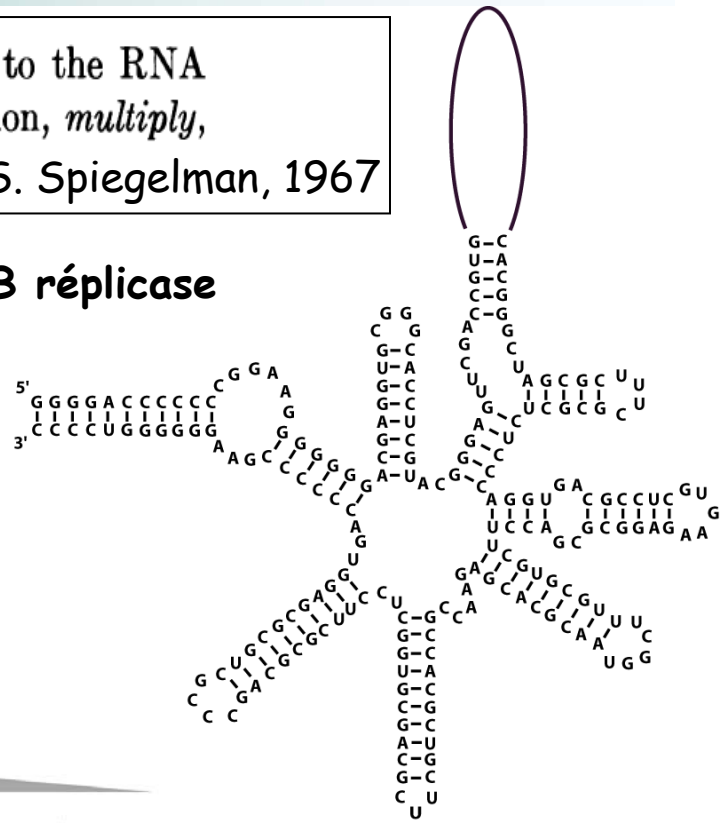
Première évolution *in vitro* d'ARN

answer to the following question: "What will happen to the RNA molecules if the only demand made on them is the Biblical injunction, *multiply*, with the biological proviso that they do so as rapidly as possible?" S. Spiegelman, 1967

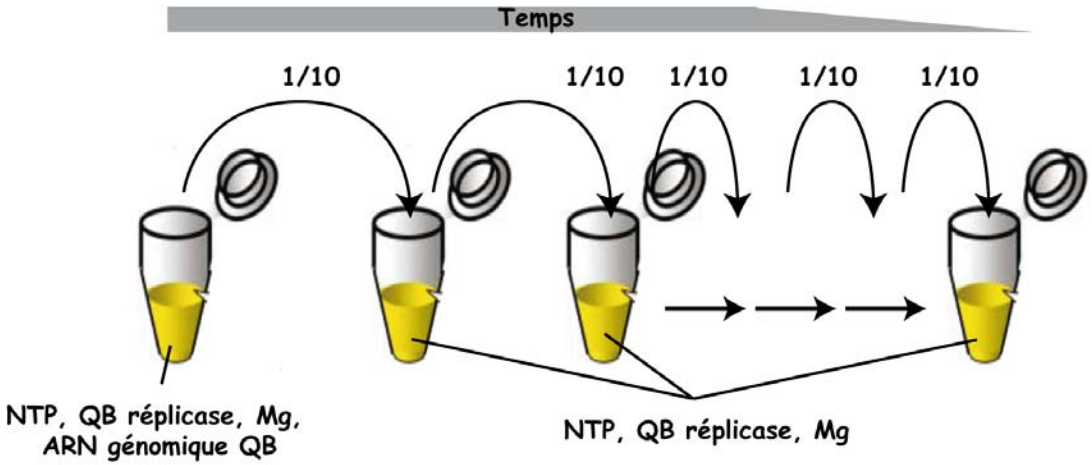
Complexe QB réplicase



Substrat QB réplicase

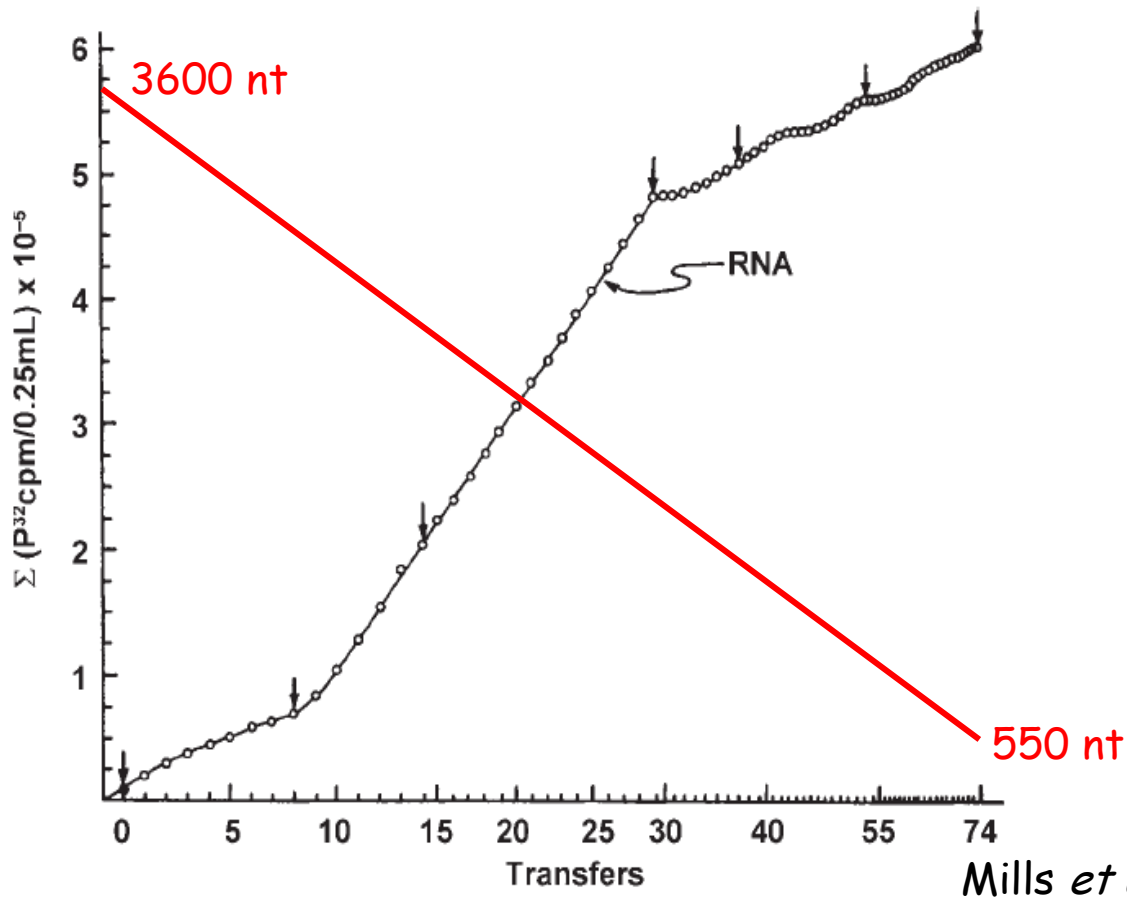


Expérience de transferts sériés



Première évolution *in vitro* d'ARN

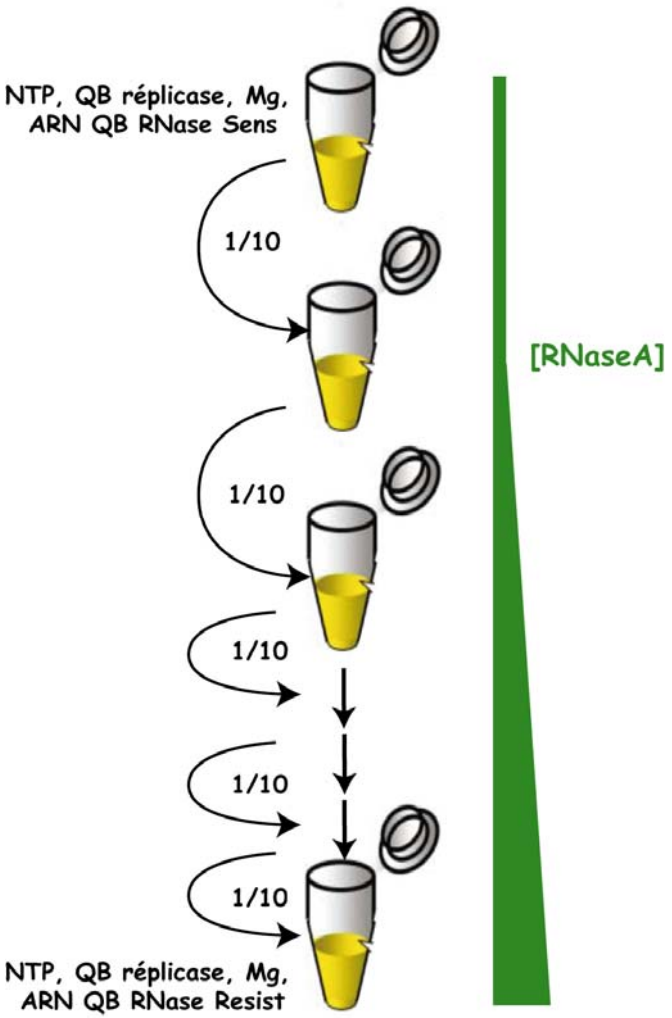
*** Pression de sélection** : vitesse de réplication

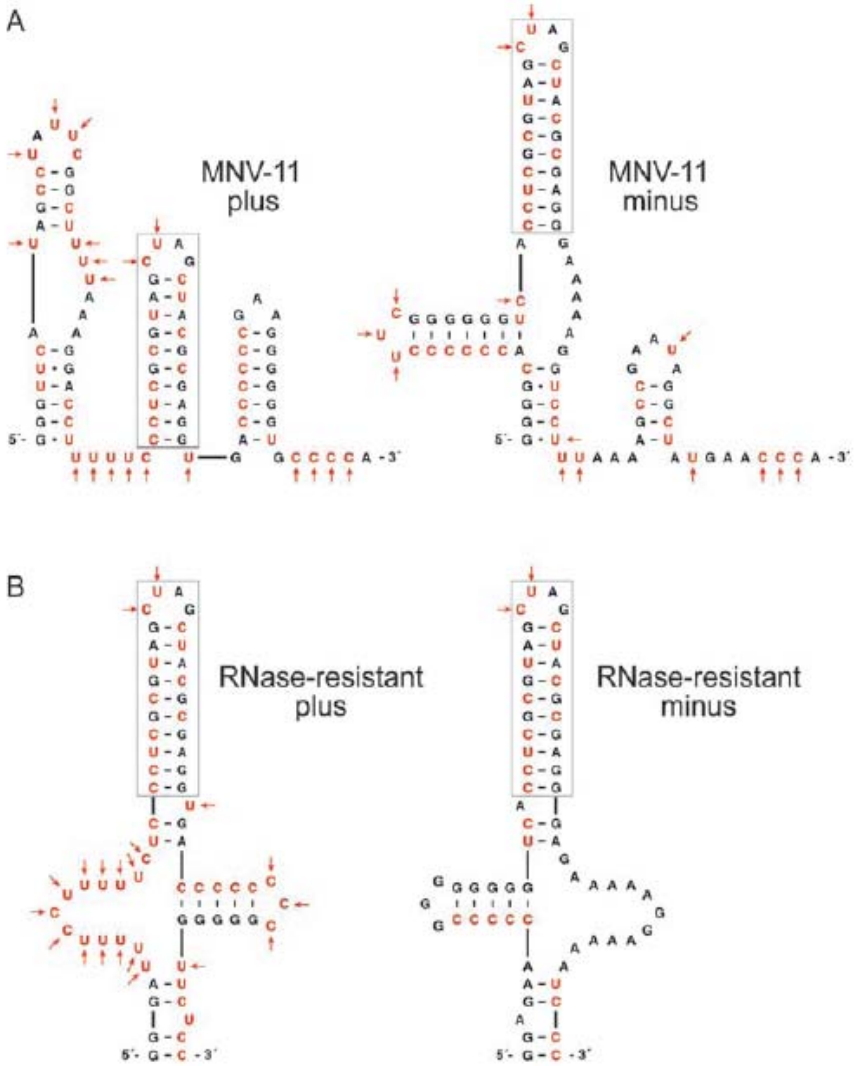


Mills *et al* (**1967**) PNAS

Elimination progressive de ce qui n'était pas nécessaire à la réplication *in vitro* de l'ARN

Evolution dirigée d'ARN avec le système Qβ : résistance à la RNase*A*





Démontre le potentiel évolutif mais peu adapter à la sélection de ligands et catalyseurs

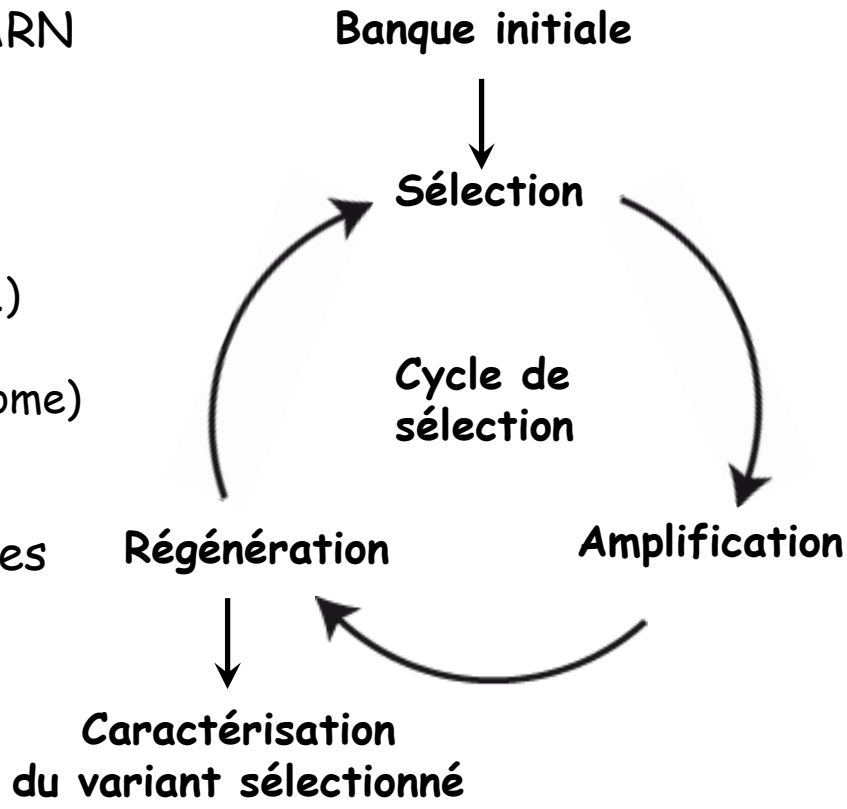
Méthode de SELEX

* **SELEX** = **S**ystematic **E**volution of **L**igands by **Ex**ponential enrichment
(Ellington et Szostak (**1990**) Nature, Tuerk et Gold (**1990**) Science)

* Sélection de banques d'ADNsb et d'ARN

* Sélection d'aptamers (ligands) de :
  - cations (Zn^{2+}, Ni^{2+}…)
  - petites molécules (colorants, aa…)
  - protéines
  - cellules et organismes (trypanosome)

* Sélection d'ARN ou d'ADN catalytiques
(ribozyme ou désoxyribozyme)

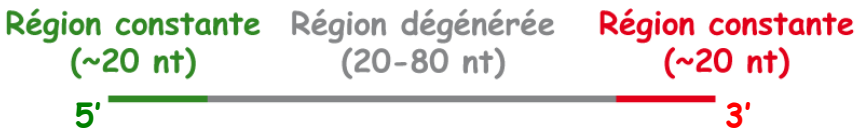


Création de la banque initiale

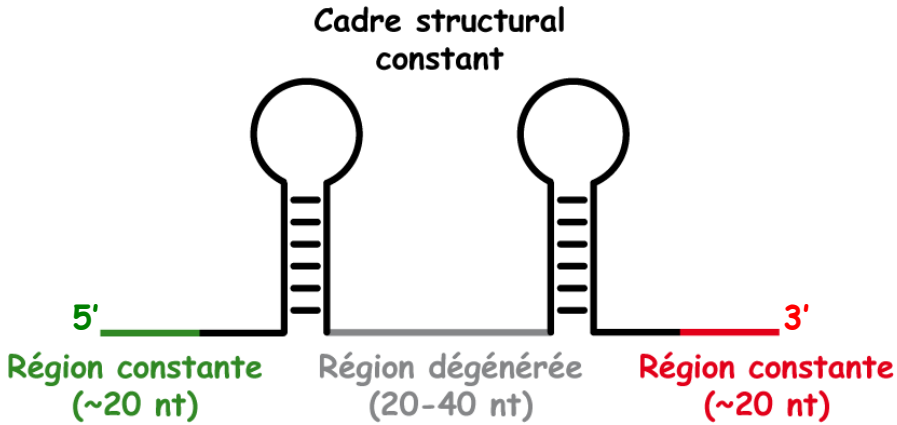
* **Amélioration de molécules** : mutagenèse aléatoire

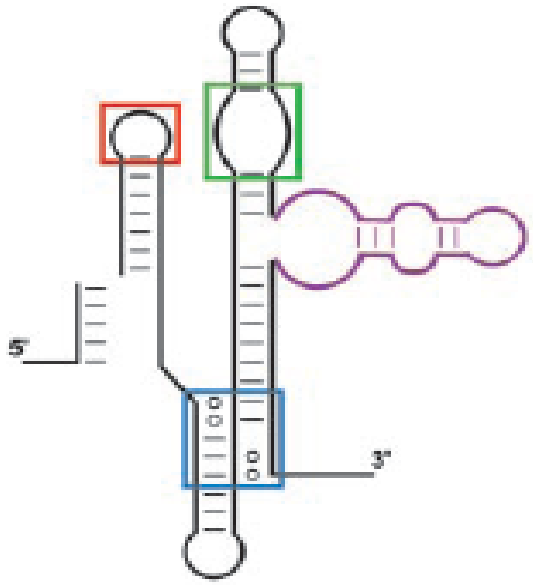
* **Evolution *de novo*** :

- banque générée d'oligonucléotides ADN de synthèse (complexité 10^{15})



- banque dégénérée dans un cadre structural





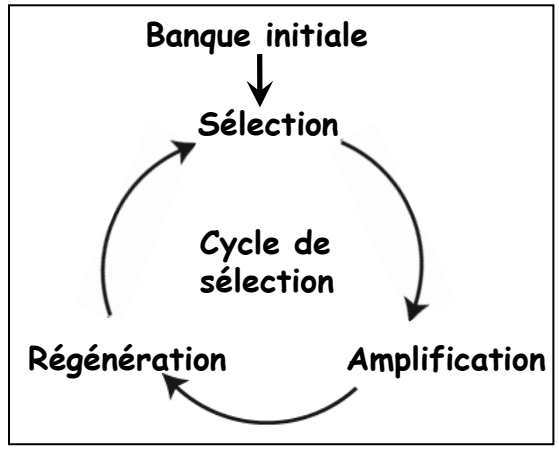
Ikawa *et al* (**2004**), PNAS

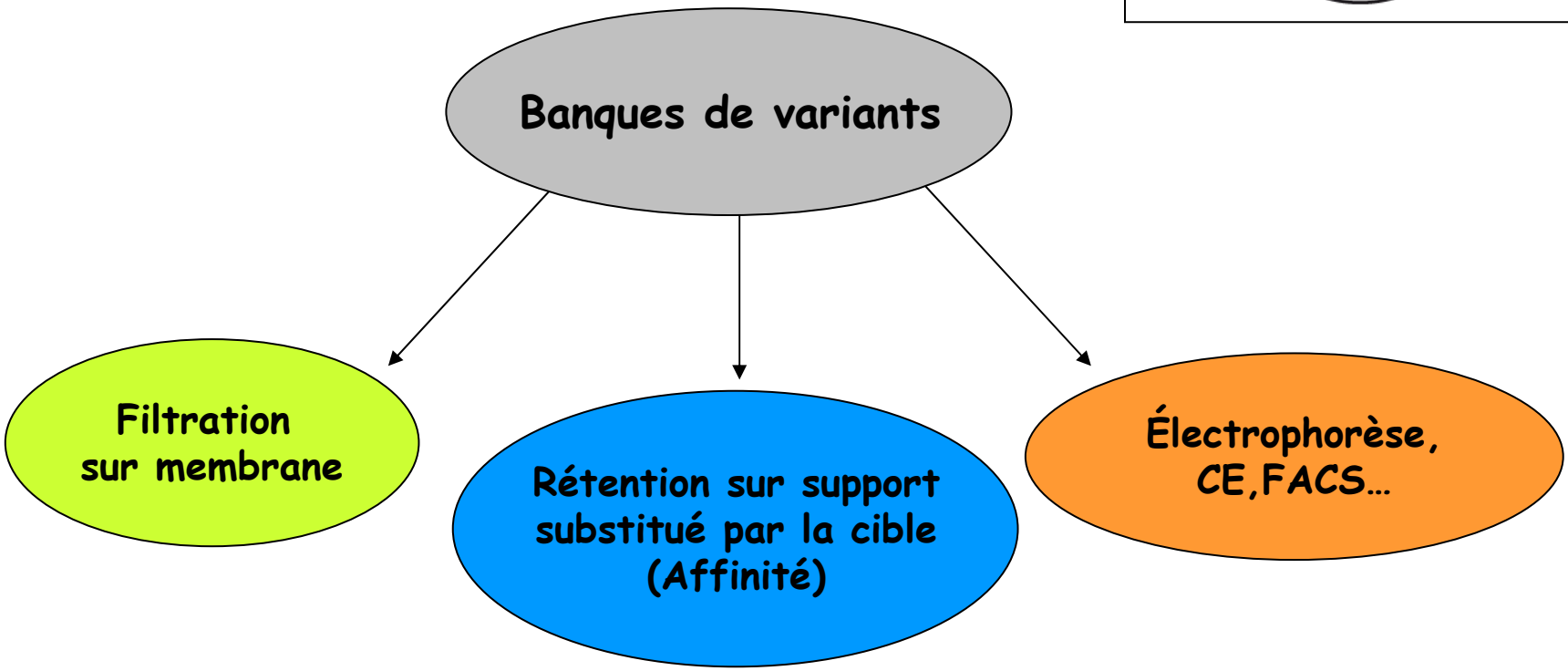
- reconstruction du second brin par PCR (1 ou plusieurs cycles)

Sélection des variants d'intérêt

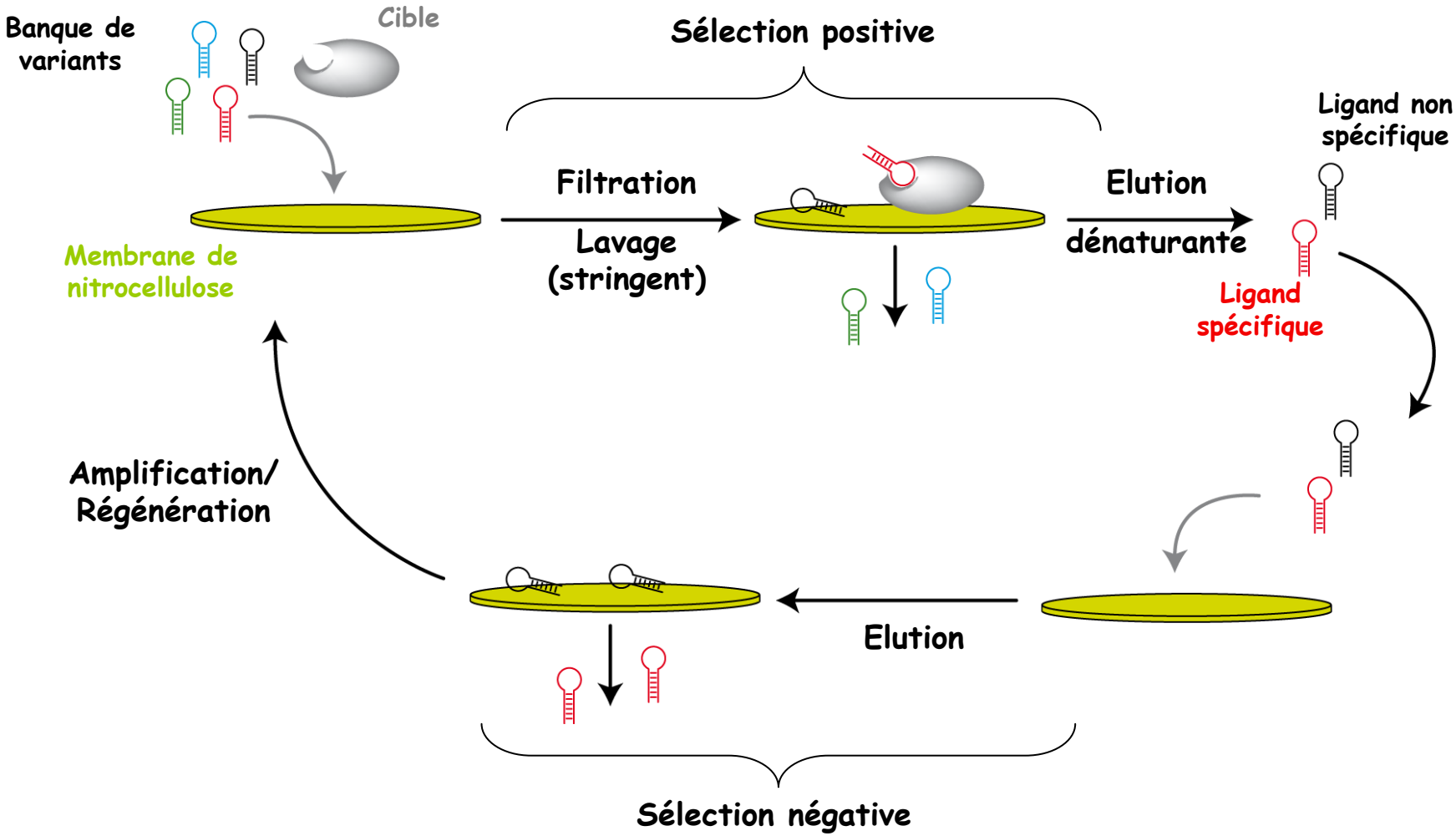
* Stratégie dictée par la nature de la cible

* Pas de protocole de sélection standard





Sélection d'aptamers par filtration



Sélection d'aptamers par filtration

* Essentiellement utilisée pour la sélection de ligand de protéine

* Protéine sous forme native ni marquée, ni immobilisée

* Nécessite peu de cible

* Interaction non-spécifique avec la membrane :
  → nécessite une sélection négative

Target	Year
T4 DNA polymerase	1990
HIV-1 Rev	1991
Reverse transcriptase (HIV-1)	1992
Bacteriophage R17 coat protein	1992
Rev-binding element of HIV-1	1993
Reverse transcriptase (avian myeloblastosis and Moloney murine leukemia)	1994
Protein kinase C βII	1994
Human α-thrombin	1994
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	1994
HIV-1 Rev	1995
HIV-1 Integrase	1995
Rous sarcoma virus (RSV)	1995
Human IgE	1996
Elongation factor SelB	1997
Keratinolytic growth factor	1997
Human rIFN-γ protein	1997
Nucleo capsid (NC) protein of HIV-1	1997
NS3 of hepatitis C virus	1997
NS3 of hepatitis C virus	1997
Coat protein of alfalfa mosaic virus	1997
HIV-1 gag polyprotein	1997
Human activated protein (APC)	1998
HIV-1 Tat	1998
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	1998
Human nonpancreatic secretory phospholipase A_2	1998
Rex fusion protein	1999
Ribosome-inactivating protein, Pepocin	2000
Ricin A chain	2000
Human factor VIIa	2000
HIV-1 Tat	2000

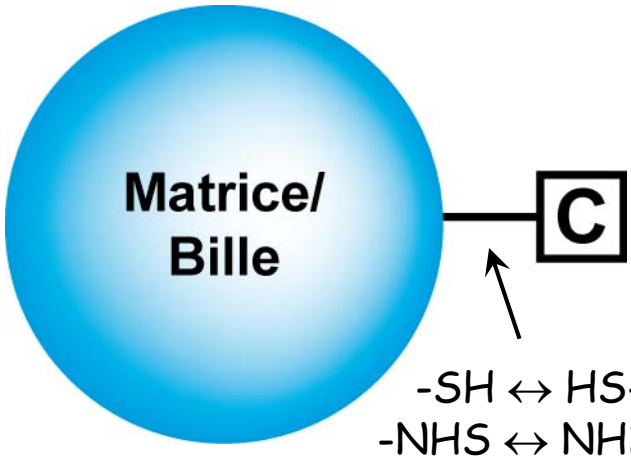
D'après Gopinath (**2007**), *Anal Bioanal Cem*

Sélection d'aptamer par affinité

* Rétention sur colonne de chromatographie ou sur billes magnétiques

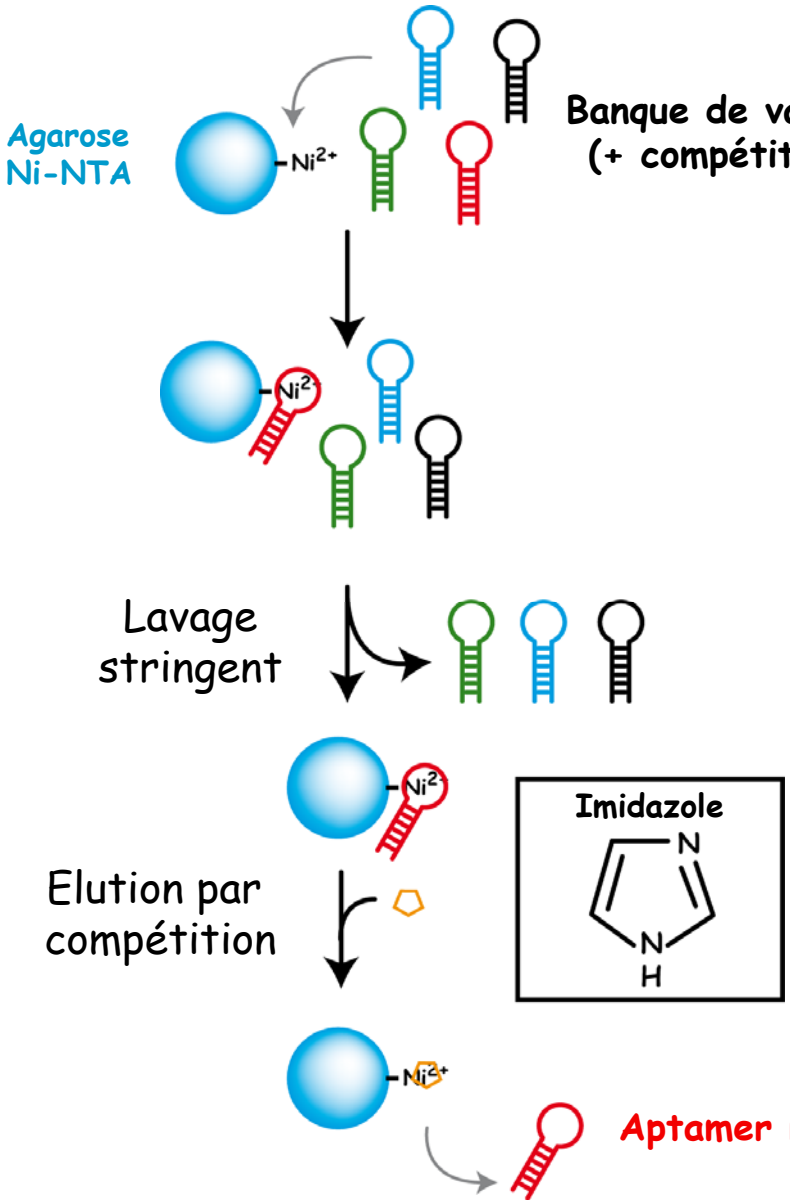
* Pas de méthodes de rétention/élution standard

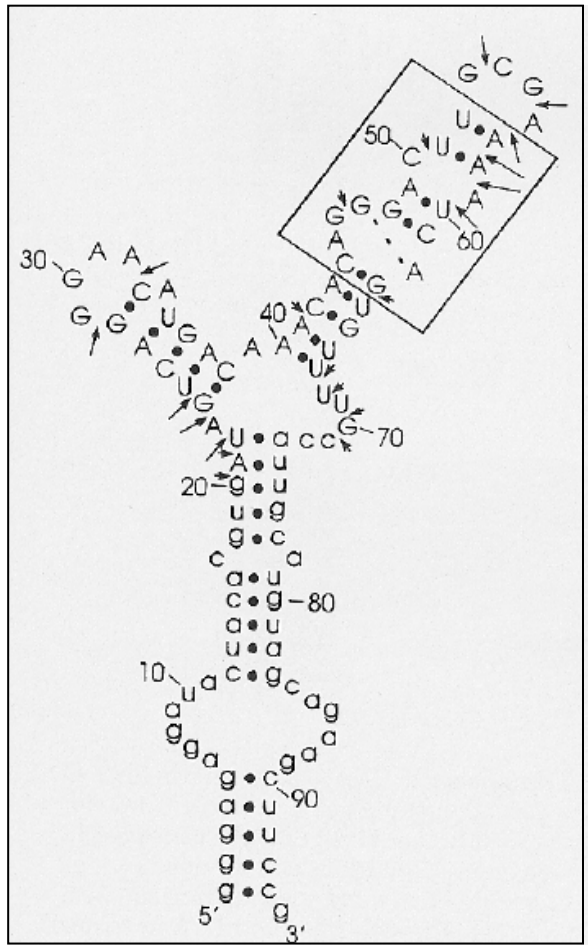
* Couplage direct de la cible à la matrice pour la sélection de ligand (aptamer)



Additifs : détergents
ARN total
BSA
Cible de structure proche
…

Sélection d'aptamers par affinité pour un métal





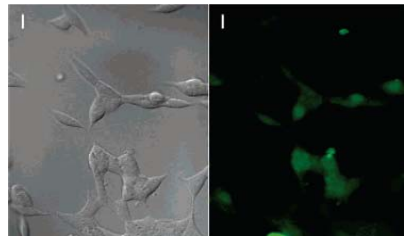
Hofmann (**1997**), RNA

Applications des aptamers

*** Molécules thérapeutiques :**

- Aptamer ARN modifié pour le VEGF, contre la dégénérescence maculaire (Macugen, Pfizer)
- Aptamer ADN pour la thrombine, anticoagulant (Phase I, Archemix)
- Aptamer ARN pour le Facteur Ixa, anticoagulant (Phase I, Archemix)

*** Marqueurs cytologiques**



Bagalkot *et al* (**2007**), NanoLet.

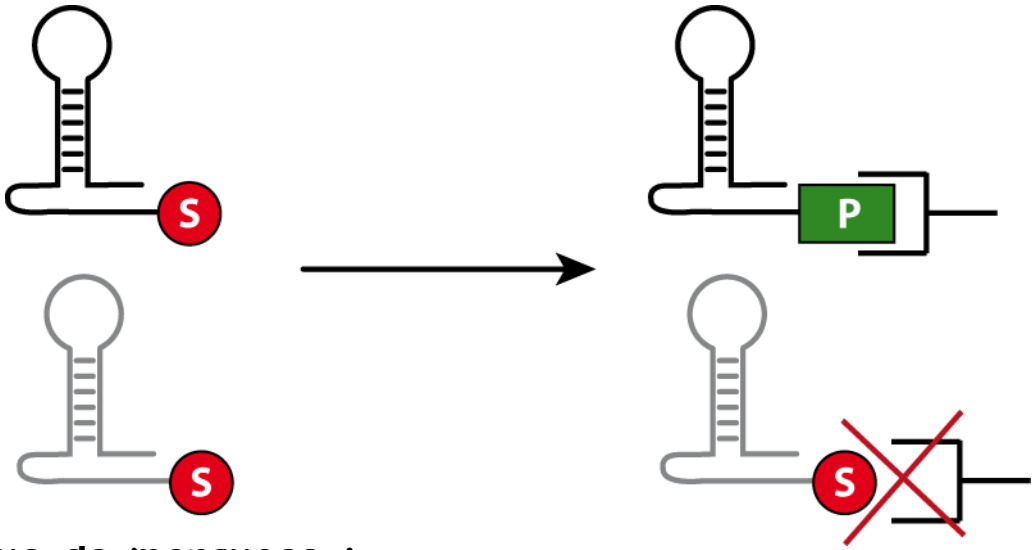
*** Fabrication de puce type array pour détection multiplex**

*** Purification de molécules (protéines, énantiomères…)**

*** Base de développement pour des acides nucléiques catalytiques**

Sélection de ribozymes

* Activité aboutit à une auto-modification rendant la molécule sélectionnable



Ribozyme actif : sélectionnable

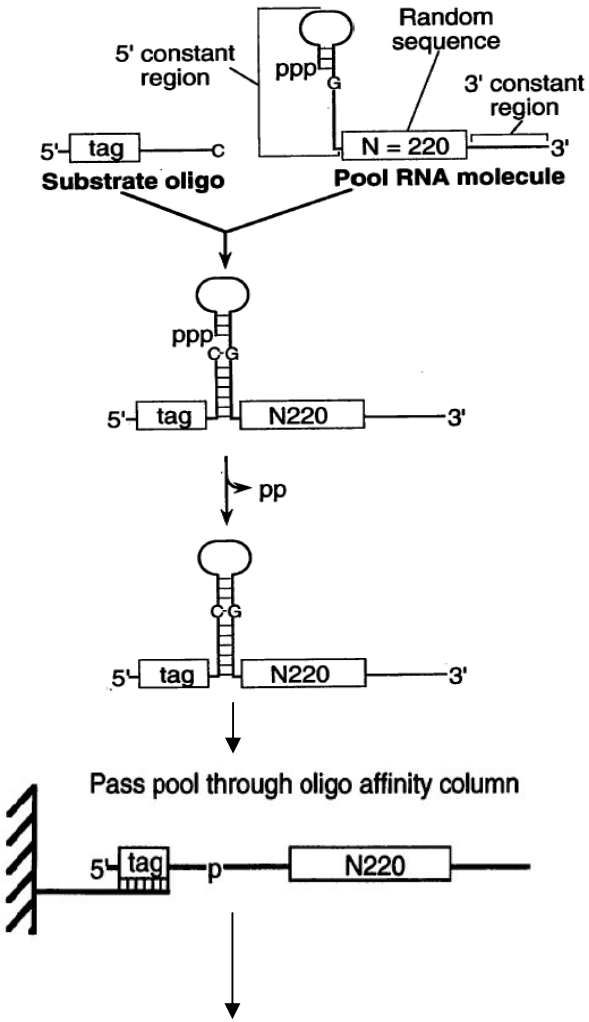
Ribozyme inactif : Non sélectionnable

* Stratégie de marquage :

- réaction à 1 substrat : substrat associé à l'a.n
  sélection du le produit (Ac)

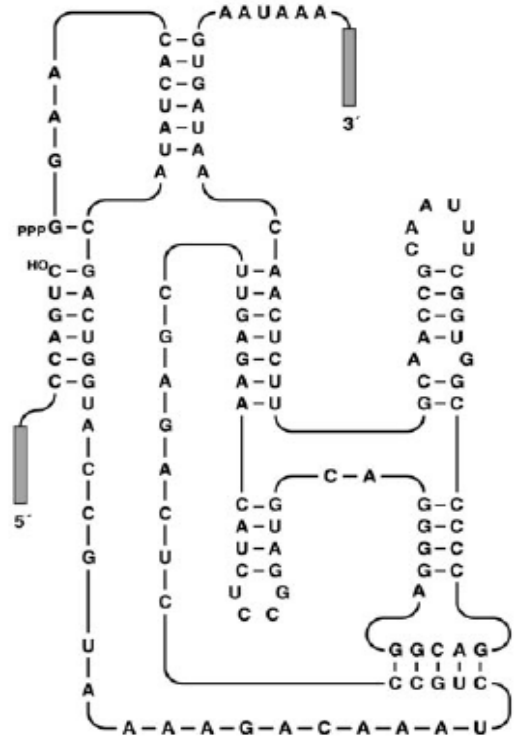
- réaction à 2 substrats : substrat 1 associé à l'a.n,
  substrat 2 associé à un tag (biotine…)

Sélection de ribozymes par rétention (ajout de tag)



Elution par dénaturation

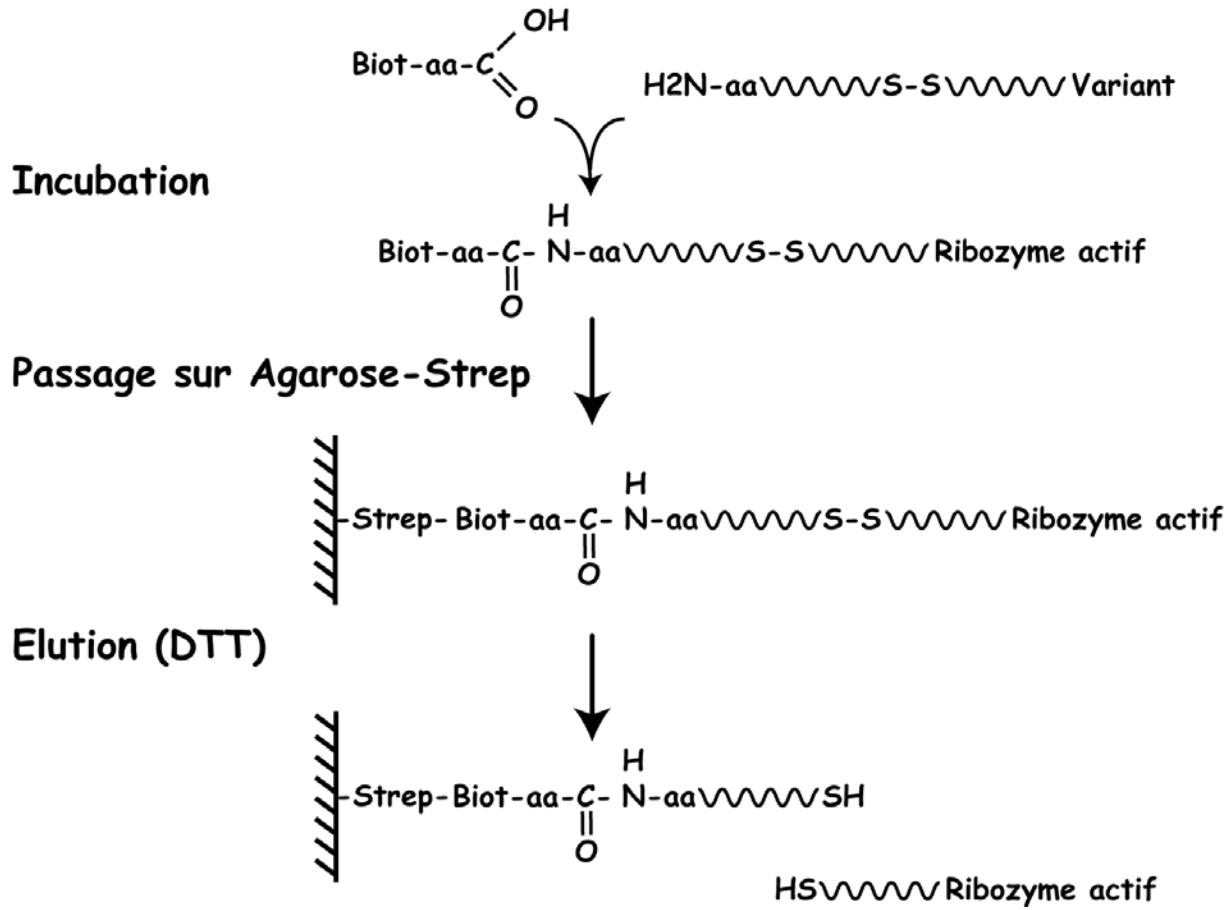
Ribozyme ARN-ligase



Ekland et Bartel (**1995**), RNA

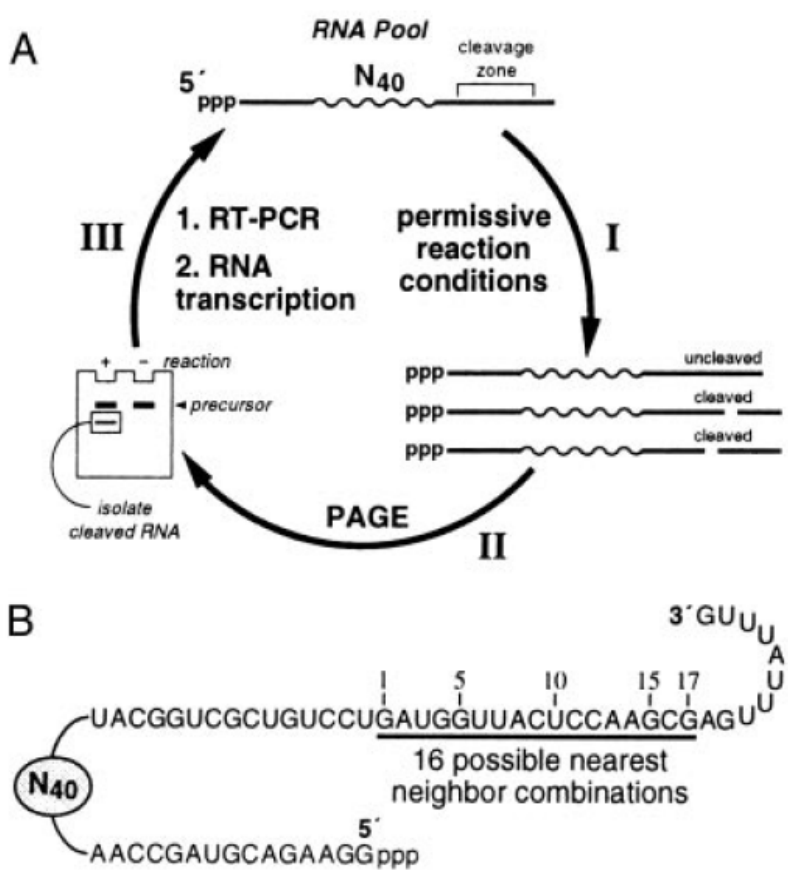
Sélection de ribozymes par rétention (ajout de tag) (2)

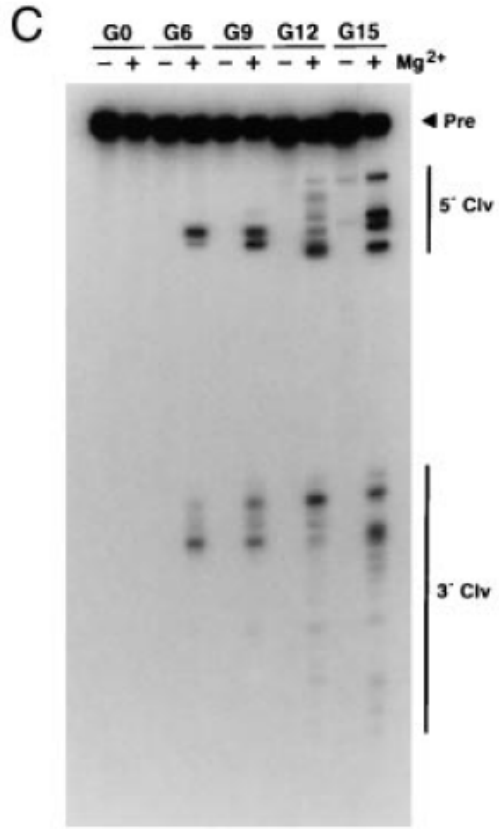
* Stratégie de sélection du ribozyme peptidyl-transférase



Zhang et Cech (**1997**), Nature

Sélection de RNase par électrophorèse



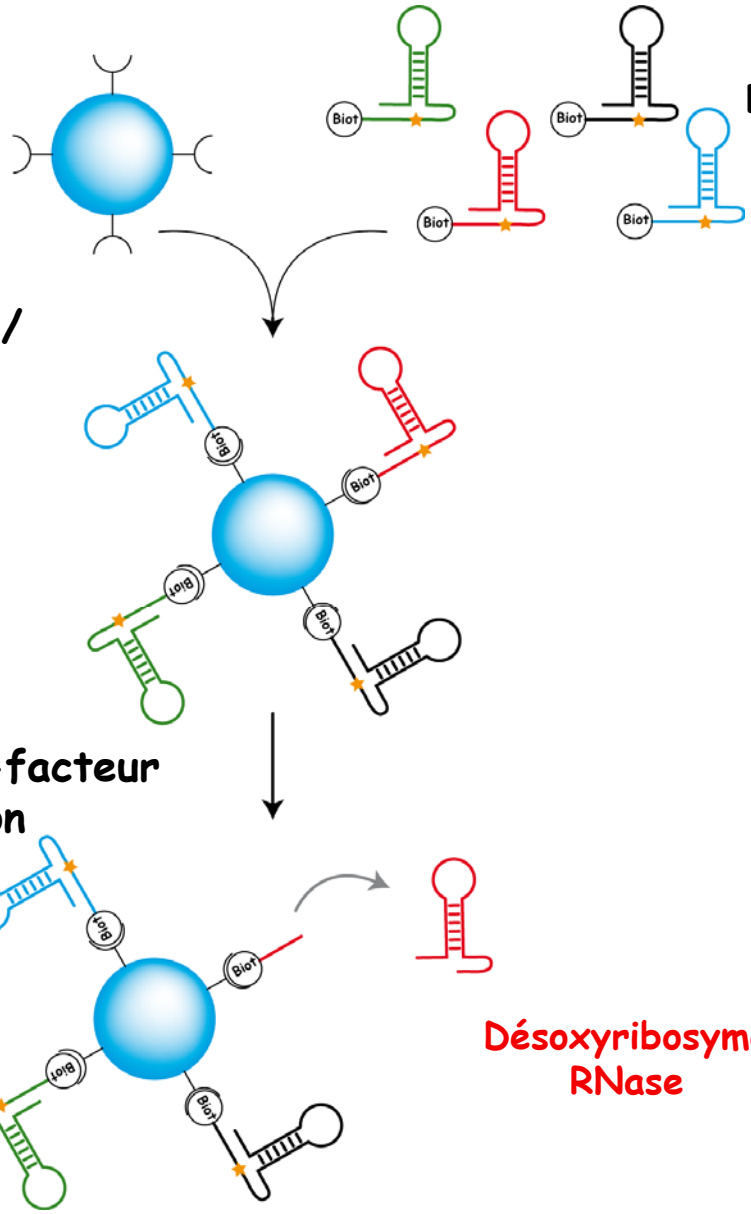


Tang et Breaker (**2000**), PNAS

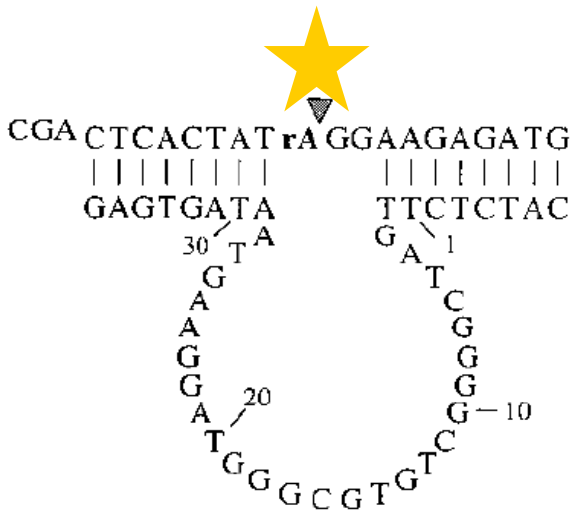
* Molécules actives sélectionnées par éléctrophorèse

* Site de coupure sélectionné par la RT-PCR

Sélection de désoxyribozyme par élution conditionnelle

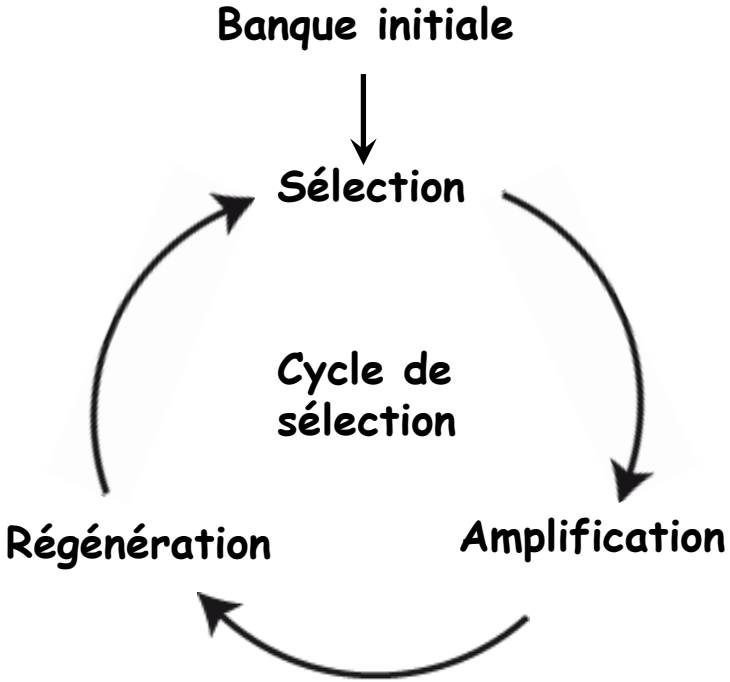


Désoxyribozyme RNase

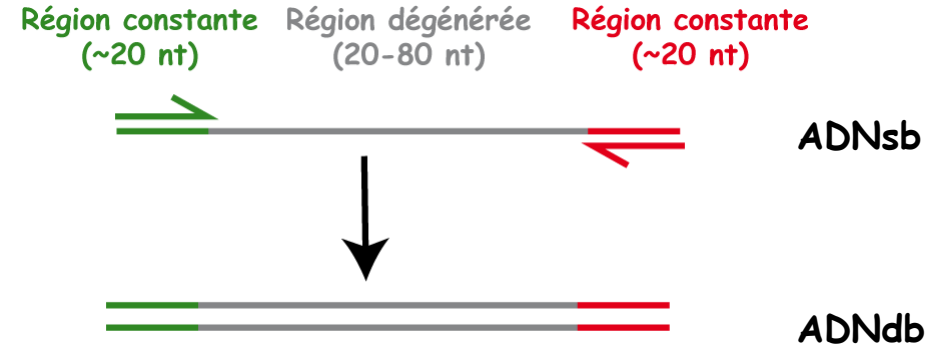


Roth et Breaker (**1998**), PNAS

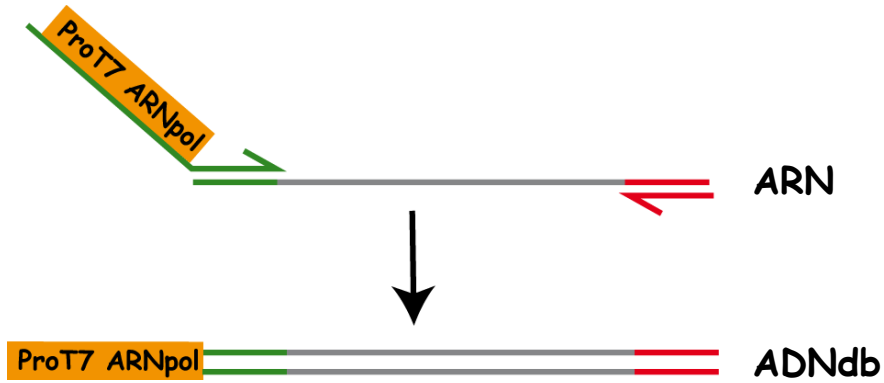
Amplification des molécules sélectionnées



*** Banque d'ADNsb :**
PCR (amorces sur régions constantes)



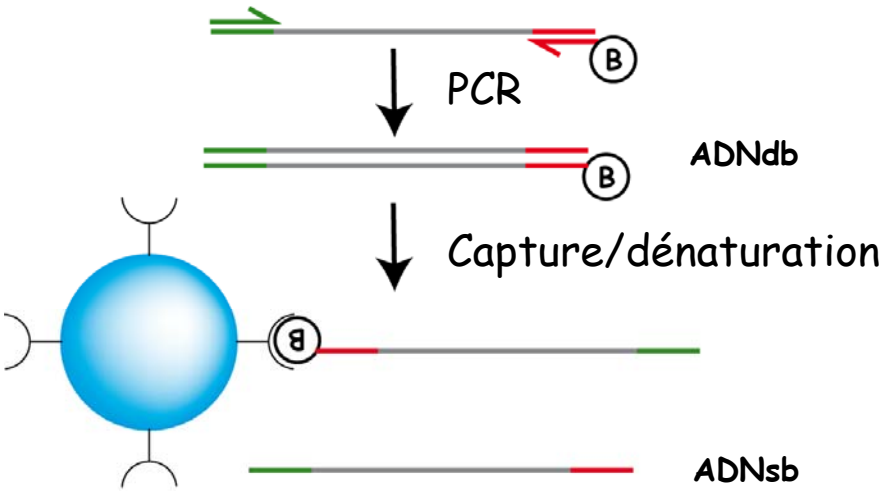
*** Banque d'ARN :**
RT-PCR (1 amorce porte le promoteur T7)

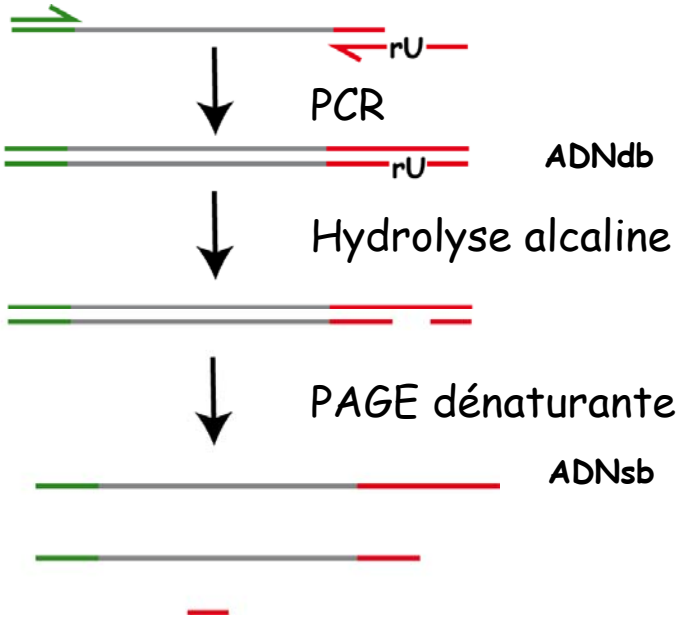


Génère de l'ADNdb donc régénération nécessaire

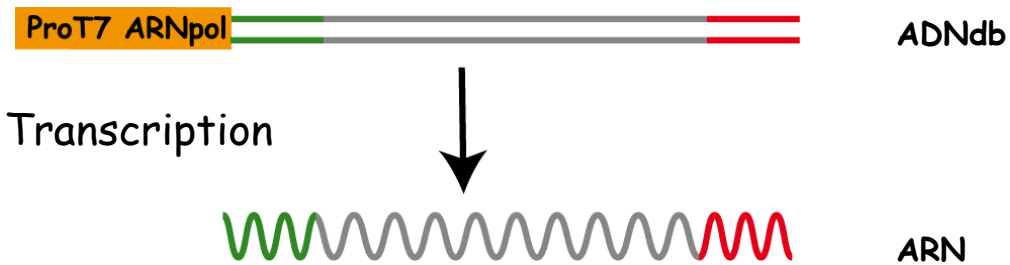
Régénération des molécules sélectionnées

*** Banque d'ADNsb :**

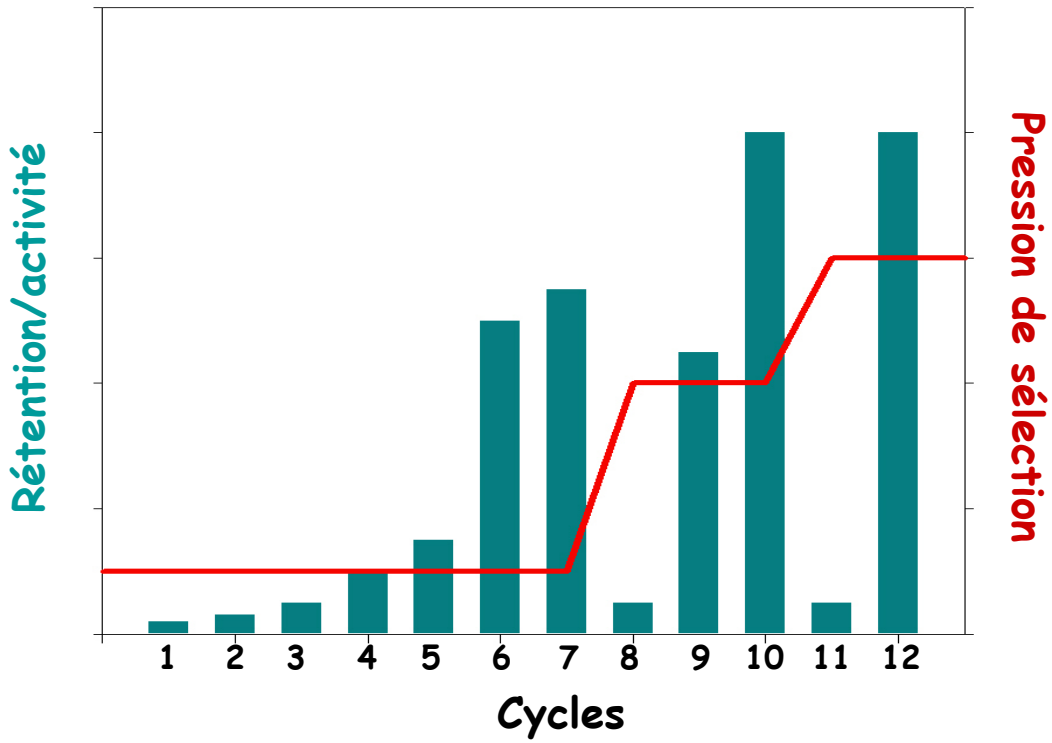


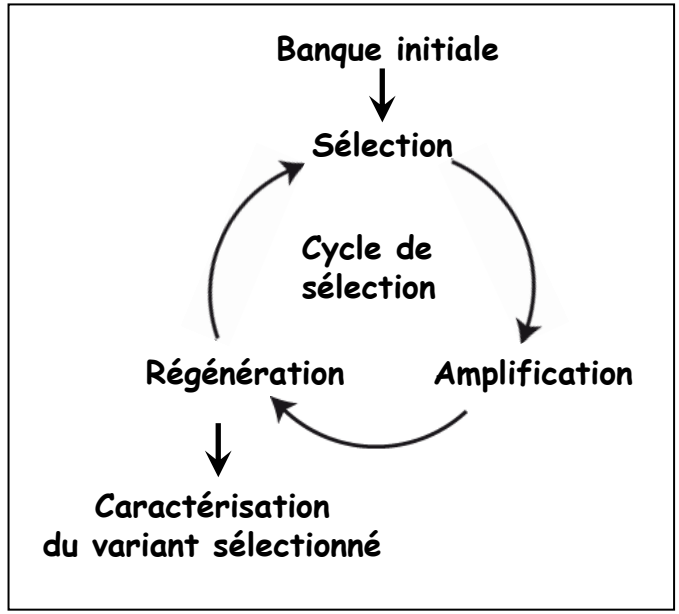


*** Banque d'ARN** : transcription *in vitro*



Profil de sélection





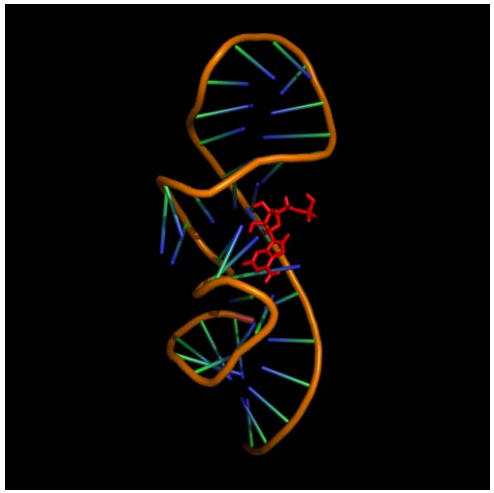
* Pression de sélection applicables (augmentation ou réduction) :

  - ligands :force ionique, pH, température, concentration en cible…

  - catalyseurs : concentration en substrat, temps…

* Etapes de mutagénèse intermédiaires possibles

Caractérisation des molécules sélectionnées



Aptamer SAM

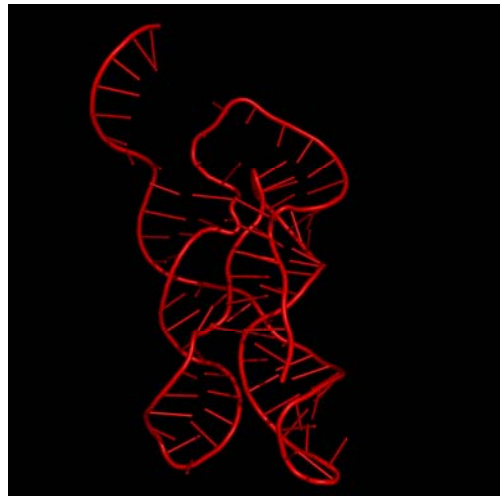
Clonage

↓

Séquençage

↓

Alignement/analyse des séquences



ARN ligase

Structure 2D/3D
Biochimie (sondage)
Bioinformatique (mfold)

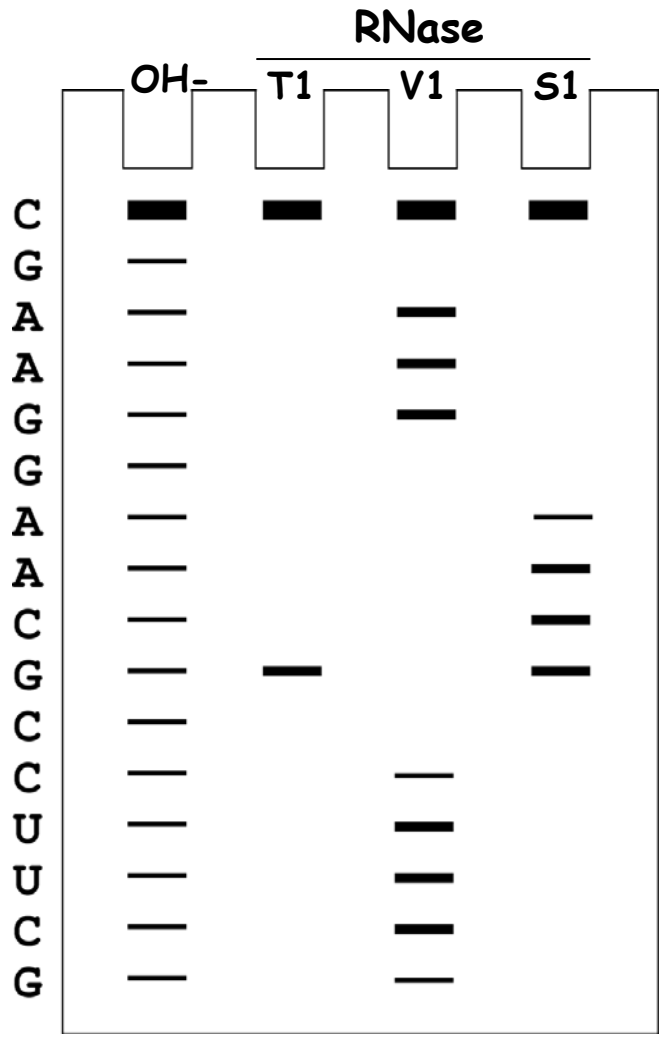
Caractérisation moléculaire

Caractérisation cinétique

Caractérisation structurale des ARN

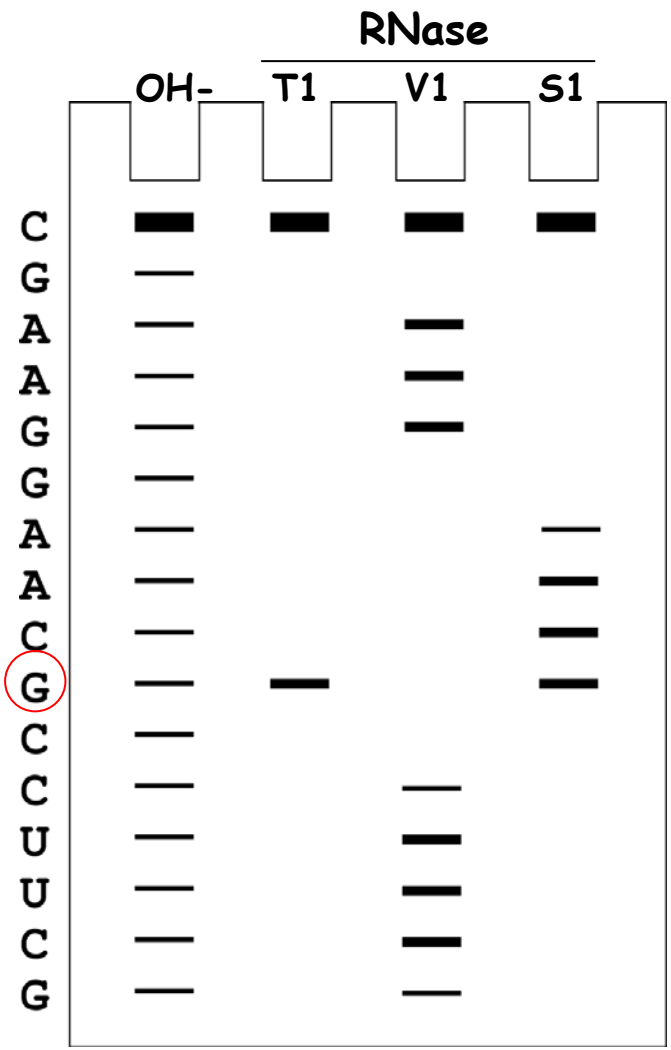
5'G C U U C C G C A A G G A A G C 3'

Sonde	Spécificité
OH-	Non spécifique
RNase V1	Régions appariées
RNase S1	Régions sb
RNase T1	G non appariés
Sondes chimiques…	Régions sb



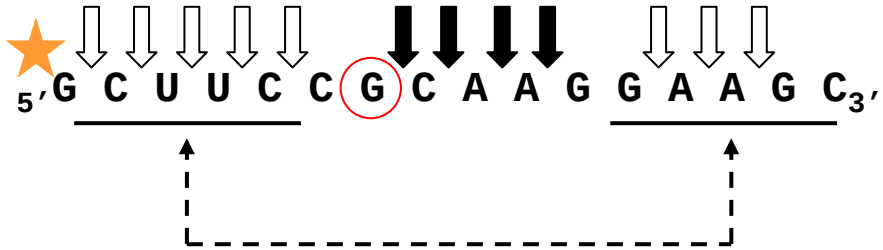
Hydrolyse faite en conditions statistiques

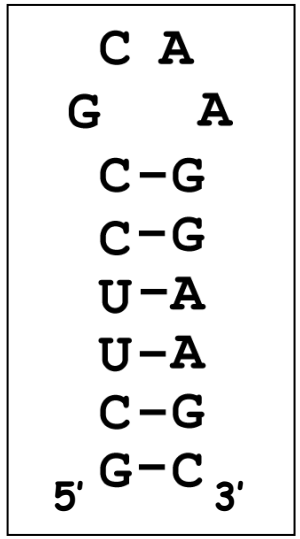
Caractérisation structurale des ARN



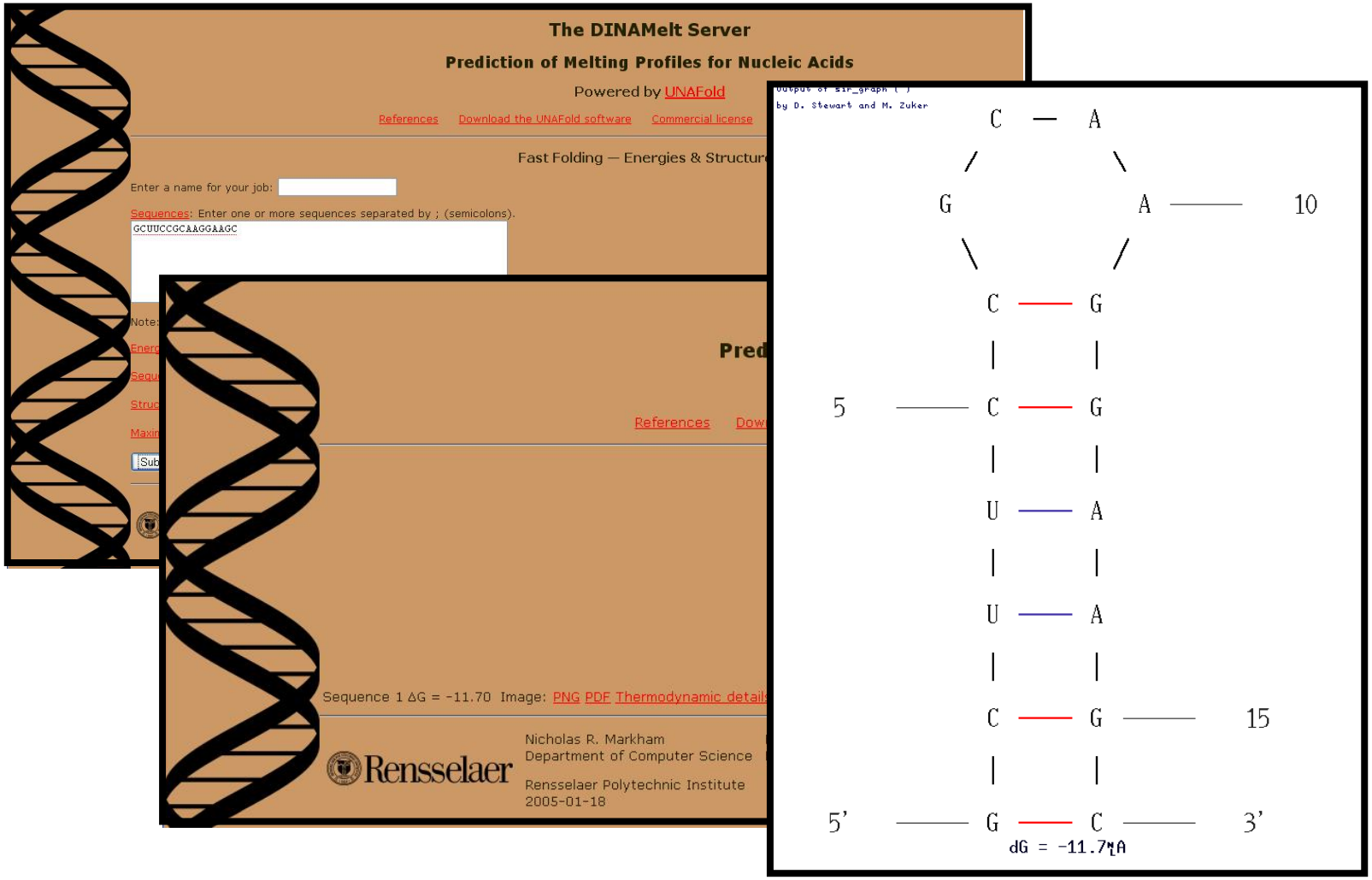
RNase V1 : ⇨

RNase S1 : ➡



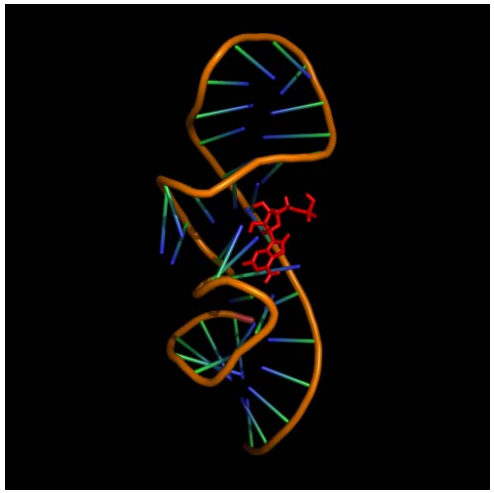


Approche bio-informatique



Attention aux artefacts liés à la « naïveté » de M-fold…

Caractérisation des molécules sélectionnées



Aptamer SAM

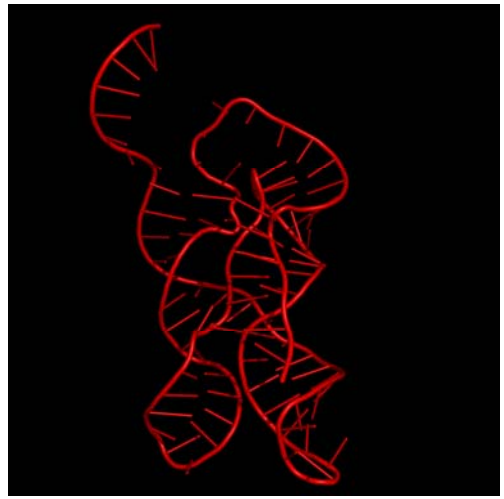
Clonage

↓

Séquençage

↓

Alignement/analyse des séquences



ARN ligase

Structure 2D/3D
Biochimie (sondage)
Bioinformatique (mfold)
Modélisation
Cristallographie

Caractérisation moléculaire
Délétion
Recherche du site actif
Ingénierie

Caractérisation cinétique
Affinité (aptamer)
Constantes cinétiques (kcat, KM…)

Bilan du SELEX

* Méthode puissante pour l'évolution dirigée d' a.n., en particulier les aptamers

* Étape de mutagenèse aléatoire réalisable entre deux cycles de sélection

* Permet de cribler rapidement de grandes banques (10^{15})

* Pas de procédure standard existante, problème pour une automatisation

* a.n. catalytiques sélectionnés par SELEX catalysent la réaction mais ne sont pas nécessairement de vrai catalyseur (1 turn-over suffit à la sélection)