

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①1 N° de publication : **3 123 357**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **21 05529**

⑤1 Int Cl⁸ : **C 07 H 21/02 (2020.12), C 12 Q 1/682**

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤4 Aptamères ARN spécifiques de conformères de fibres de la protéine γ -synucléine.

②2 Date de dépôt : 27.05.21.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public
de la demande : 02.12.22 Bulletin 22/48.

④5 Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 12.04.24 Bulletin 24/15.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE
ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES
ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACTERE
INDUSTRIEL ET COMMERCIAL —FR et CENTRE
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
(CNRS) TABLISSEMENT PUBLIC A CARACTERE
SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE — FR.

⑦2 Inventeur(s) : BOUVIER-MÜLLER ALIX, DUCONGE
Frédéric, BOUSSET LUC et MELKI RONALD.

⑦3 Titulaire(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES ETABLISSEMENT
PUBLIC A CARACTERE INDUSTRIEL ET COMMERCIAL,
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
(CNRS) TABLISSEMENT PUBLIC A CARACTERE
SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE.

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

FR 3 123 357 - B1



Description

Titre de l'invention : Aptamères ARN spécifiques de conformères de fibres de la protéine α -synucléine

Domaine de l'invention

- [0001] La présente invention concerne les domaines des aptamères et des maladies neurodégénératives, en particulier des synucléinopathies.
- [0002] La présente invention concerne un aptamère caractérisé en ce qu'il possède la capacité de distinguer les conformères de fibres d' α -Syn de type F de la protéine α -Synucléine (α -Syn) des conformères de fibres d' α -Syn de type R, et en ce qu'il comprend une séquence spécifique d'acide ribonucléique modifié (ARN modifié) ayant au moins 85% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :6, et SEQ ID NO :7, de préférence choisie parmi SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2.
- [0003] La présente invention se rapporte en outre à une composition ou à un kit comprenant au moins un de ces aptamères, ainsi qu'à leurs utilisations. La présente invention porte également sur une méthode de diagnostic de maladies neurodégénératives ainsi qu'une méthode de stratification, de suivi, de pronostic et d'évaluation de l'efficacité d'un traitement d'une synucléinopathie, comprenant l'utilisation d'au moins un aptamère et/ou une composition et/ou un kit susmentionné.

Etat de la Technique

- [0004] Le diagnostic des maladies neurodégénératives, telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, d'Huntington, de Creutzfeldt-Jakob ou la démence à corps de Lewy, repose sur l'observation des troubles cognitifs, moteurs et sensoriels éprouvés par les patients. Ce diagnostic est cependant rendu difficile à poser car les symptômes de ces différentes maladies sont très similaires, surtout aux premiers stades de la maladie. Souvent, un diagnostic certain ne peut être posé que lorsque la maladie a atteint un stade avancé et que le patient souffre des formes les plus sévères des symptômes (Gómez-Río et al., 2016). Il est donc capital de mettre au point de nouvelles méthodes de diagnostic permettant de faire une distinction fiable entre les différentes maladies neurodégénératives (MNs). En sus, un meilleur diagnostic permettrait de donner aux patients un suivi et un pronostic plus fiable de l'évolution de la maladie, et de mieux évaluer l'efficacité des traitements administrés.
- [0005] De plus, les symptômes moteurs liés à ces maladies apparaissent souvent très tard dans le processus, alors que les dommages neuronaux sont déjà très importants. Par exemple, on estime que lorsque les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson apparaissent, 50% des neurones dopaminergique de la *substantia nigra* sont déjà morts

(Cheng et al., 2010). Pouvoir détecter le début des MNs avant l'apparition des symptômes moteurs est donc essentiel, car cela permettrait de commencer des traitements plus tôt, lorsque le phénomène de neurodégénérescence n'a pas encore pris trop d'ampleur.

- [0006] Deux types de marqueurs ont été plus particulièrement étudiés pour diagnostiquer les MNs: les biomarqueurs génétiques et biochimiques.
- [0007] Les biomarqueurs génétiques peuvent être des allèles ou des mutations dans le génome qui ont été identifiés comme prédisposant à la maladie. Ce type de marqueurs permet ainsi d'identifier une population « à risque », qui a une plus forte probabilité de développer des MNs.
- [0008] Les marqueurs biochimiques sont des biomolécules dont la présence et/ou la quantité est corrélée à l'évolution de la pathologie. Par exemple, la maladie de Parkinson est marquée d'un point de vue histologique par l'accumulation d'alpha-Synucléine (ou α -Synucléine ou α -Syn) au sein de corps de Lewy (Katsuno et al., 2018). Les marqueurs biochimiques sont donc considérés comme des marques de l'apparition et du développement de la maladie alors que les biomarqueurs génétiques sont plutôt des facteurs de prédisposition à développer la maladie. L'identification de marqueurs biochimiques peut ainsi permettre de détecter l'apparition d'une maladie de manière précoce, de réaliser des diagnostics plus précis, de suivre l'évolution de la maladie plus facilement, et aussi d'évaluer avec précision l'efficacité d'une thérapie. Actuellement, de nombreux efforts sont donc à l'œuvre pour identifier de tels marqueurs qui seraient présents dans les tissus ou fluides biologiques des patients (sang, sérum, fluide cérébrospinal etc.) et consisteraient en des signatures distinctives de chaque maladie (Agrawal and Biswas, 2015; Beach, 2017).
- [0009] L'accumulation d'agrégats de protéines dans le système nerveux central est une caractéristique commune à plusieurs troubles neurodégénératifs progressifs (par exemple les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, d'Huntington et de Creutzfeldt-Jakob). Un mauvais repliement tridimensionnel de certaines protéines peut augmenter leur tendance à se lier entre elles et à transmettre ce mauvais repliement les unes aux autres. Les formes agrégées de ces protéines s'accumulent alors progressivement et peuvent interférer avec la fonction normale des neurones, ce qui peut progressivement aboutir à leur mort. Parmi les protéines pouvant former ce type d'agrégats, on peut citer la protéine α -Synucléine, la protéine Tau, l'Huntingtine, le peptide bêta-amyloïde ou la protéine PrP.
- [0010] Il a été démontré que la conformation tridimensionnelle pathologique de ces protéines pouvait être transmissible non seulement entre les cellules mais également d'un individu à l'autre. Ceci a permis de démontrer que certaines protéines, appelées "Prions", pouvaient être des agents infectieux au même titre que les virus, les bactéries

et les parasites. Même si la transmission d'un individu à l'autre a surtout été démontrée pour la protéine PrP, des études récentes ont démontré que d'autres protéines impliquées dans les maladies neurodégénératives pourraient avoir des propriétés comparables. Parmi ces protéines, on peut également citer la protéine α -Synucléine, la protéine Tau, l'Huntingtine ou le peptide bêta-amyloïde.

[0011] Les fibres d' α -Synucléine (α -Syn) sont retrouvées au sein d'agrégats de protéines dans le cerveau de patients souffrant de certaines MNs regroupées sous le nom de « synucléinopathies ». Ces maladies comprennent entre autres : la maladie de Parkinson (MP), la démence à corps de Lewy (DCL) et l'atrophie Multi-Systématisée (AMS). Les fibres d' α -Syn sont composées de milliers de répétitions de protéine anormalement repliées. Elles se forment par recrutement successif des protéines, selon un mécanisme de propagation où une protéine d' α -Syn mal repliée transmet sa conformation erronée lorsqu'elle se lie à une autre protéine. Récemment, plusieurs formes de fibres d' α -Syn avec des conformations structurales distinctes ont été isolées et il a été mis en évidence qu'elles pourraient induire des pathologies différentes (Peelaerts et al., 2015; Rey et al., 2019). Ces différentes conformations sont appelées des conformères. Parmi ces conformères, on peut citer les conformères de fibres d' α -Syn de type F, R, 91 et 65 (Bousset et al., 2013; Makky et al., 2016). Les conformères de fibres d' α -Syn de type F, 65 et 91 ont une forme cylindrique, tandis que les conformères de fibres de type R ont une forme de rubans plats, les fibres 91 et 65 sont torsadées mais avec des pas d'hélices différents. Des analyses par RMN du solide et microscopie à force atomique ont permis de préciser les différences structurales entre ces quatre conformères de fibres. Ainsi ces conformères de fibres sont longues de 1 à 2 μ m en moyenne, avec une largeur de l'ordre de 15 à 20 nm, les conformères de fibres d' α -Syn de type F étant les moins larges, et les conformères de fibres 65 les plus larges. Leur hauteur est de l'ordre de 5 à 7 nm, les conformères de fibres d' α -Syn de type R étant les moins hautes et les conformères de fibres 65 les plus hautes. Enfin, les conformères de fibres 65 et 91 présentent des variations périodiques de la hauteur, à la différence des conformères de fibres d' α -Syn de type F et R. D'autres analyses ont aussi mis en évidence que les quatre conformères de fibres avaient des propriétés mécaniques différentes. Ainsi, les conformères de fibres d' α -Syn de type F sont les plus rigides, avec une mesure de la résistance à la flexion quatre fois supérieure au conformères de fibre R et deux fois supérieure aux conformères de fibres 65 et 91. Les conformères de fibres d' α -Syn peuvent également être distingués les uns des autres par une analyse par protéolyse ménagée à la protéinase K. Leur différence structurale aboutit à des profils de dégradation qui sont différents d'un conformère à une autre. Ces profils sont comparables à des codes barres (ou empreinte digitales) spécifiques à chaque conformère (voir un exemple de profil de dégradation en [Fig.1] (Landureau et al., 2021)). De plus, la

forme entière de la protéine dans les conformères de fibres d' α -Syn de type F est plus résistante à la protéolyse que dans le conformère de type R (Fenyl et al., 2021).

- [0012] Différentes études suggèrent que ces différents conformères de fibres d' α -Syn pourraient être des marqueurs spécifiques des différentes synucléinopathies. Un modèle animal de rat a permis de mettre en évidence que l'injection de conformères de fibres de type F ou R dans le cerveau d'animaux conduisait à deux phénotypes différents. Il a été notamment montré que les conformères de fibres d' α -Syn de type F provoquaient dans ce modèle un déficit moteur plus important, tandis que les conformères de fibres d' α -Syn de type R engendraient un nombre plus important de dépôts de types de corps et de neurite de Lewy (Peelaerts et al., 2015). Des études plus récentes ont mis en évidence que les conformères de fibres obtenues chez des patients souffrant de MP ou d'AMS ressemblaient aux conformères de fibres de type R tandis que les fibres issues des patients souffrant de DCL ressemblaient aux conformères de fibres de type F (Van der Perren et al., 2020).
- [0013] Il est donc essentiel de développer des méthodes permettant une détection efficace, spécifique, sensible et fiable de ces marqueurs.
- [0014] Plusieurs anticorps ont été développés pour pouvoir quantifier l' α -Syn dans le plasma ou le liquide céphalo-rachidien (LCR) (WO2007/011907 ; Perrin et al., 2003; Vaikath et al., 2019). Cependant, la plupart de ces anticorps ne sont pas spécifiques d'une conformation particulière de la protéine. De ce fait, ils permettent de doser la protéine mais ne sont pas utiles d'un point de vue diagnostique car ils ne permettent pas de déterminer la quantité de protéine qui est sous forme agrégée. De nouveaux anticorps ont été développés pour reconnaître spécifiquement la forme agrégée de la protéine par rapport à la forme monomérique (Vaikath et al., 2015). Cependant, ces anticorps ne sont pas spécifiques d'un type de fibre particulier. D'autre part, il est toujours difficile et coûteux d'utiliser plusieurs anticorps pour quantifier plusieurs biomarqueurs en même temps.
- [0015] Dans ce contexte, les aptamères offrent des possibilités avantageuses. Les aptamères sont des structures d'acides nucléiques ayant des propriétés comparables aux anticorps. Ils sont généralement obtenus par un processus d'évolution moléculaire dirigée nommé SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment). Depuis la découverte du SELEX dans les années 90, l'utilisation des aptamères a été validée expérimentalement pour de nombreuses applications (diagnostic, purification, thérapie...). De plus, un aptamère anti-VEGF (Macugen®) a d'ores et déjà reçu une AMM pour le traitement des dégénérescences maculaires de l'œil.
- [0016] Quelques études ont conduit à l'identification d'aptamères d'ADN reconnaissant l' α -Syn. Un aptamère ADN (nommé M5-15) a été sélectionné contre la forme monomérique d' α -Syn. Toutefois, cet aptamère se fixe également de manière non

spécifique sur les formes oligomériques et fibrillaires d' α -Syn (Tsukakoshi et al., 2010). Une deuxième étude a permis d'obtenir un second aptamère ADN (T-SO508) capable de discriminer la forme oligomérique des formes monomériques et fibrillaires d' α -Syn. Néanmoins des tests complémentaires ont mis en évidence que cet aptamère reconnaissait également la forme oligomérique d'Amyloïde- β avec une affinité du même ordre de grandeur (Kd d'environ 100 nM ; Tsukakoshi et al., 2012). Les aptamères F5R1 et F5R2, qui sont également en chimie ADN, ont été sélectionnés en 2019 par Zheng et ses collaborateurs. Ils reconnaissent l' α -Syn avec des kd respectivement de 2.4 et 3.07 nM (Zheng et al., 2018; Ren et al., 2019). D'autres aptamères en chimie ADN ont également été sélectionnés par Derosa et ses collaborateurs (WO201979887). Aucun de ces différents aptamères n'a été évalué pour sa capacité à discriminer différents conformères de fibres d' α -Syn.

[0017] Au vu de l'importance des fibres d' α -Syn et, notamment des conformères de fibres d' α -Syn de type F et R, dans le diagnostic de différentes maladies neurodégénératives, il est primordial de mettre au point des molécules capables de distinguer les différents conformères de fibres d' α -Syn, en particulier des conformères de fibres d' α -Syn de type F et R.

[0018] La présente invention permet de répondre à ce besoin.

Exposé de l'invention

[0019] Dans le cadre de la présente invention, les Inventeurs ont mis au point des aptamères d'acide ribonucléique (ARN) capables de reconnaître de manière spécifique certains conformères de fibres d' α -Syn. Les Inventeurs ont en effet sélectionné et isolé des aptamères ARN ayant des affinités différentes pour différents conformères de fibre d' α -Syn.

[0020] Les Inventeurs ont notamment montré que, de manière surprenante, les aptamères mis au point sont capables de distinguer les conformères de fibres d' α -Syn de type F des conformères de fibres d' α -Syn de type R, à la différence des aptamères ADN contre l' α -Syn décrits dans l'art antérieur.

[0021] Les données montrent en particulier que les aptamères mis au point par les Inventeurs ont une forte affinité pour le conformère de fibres d' α -Syn de type F (constante de dissociation K_d entre 5 et 10 nM). De manière inattendue, ces aptamères présentent en revanche une affinité très faible voire nulle pour le conformère de fibres d' α -Syn de type R. Les Inventeurs ont également mis en évidence que ces aptamères reconnaissent avec une affinité au moins 10 fois plus faible la protéine α -Syn sous forme native (forme monomérique, non fibrillaire). De façon remarquable, les Inventeurs ont développé une méthode utilisant un mélange de ces aptamères qui permet de discriminer efficacement ces conformères de fibre par séquençage à haut-débit, ap-

plicables à des échantillons de patients.

- [0022] Les données montrent que ces aptamères sont des outils de détection spécifique et sensible des différentes fibres d' α -Syn. La présente invention fournit donc à la fois des méthodes de diagnostic efficace et fiable des maladies neurodégénératives, des méthodes de criblage de molécules mais également des outils pour la recherche dans le domaine des maladies neurodégénératives.
- [0023] La présente invention concerne donc un aptamère caractérisé en ce qu'il possède la capacité de distinguer les conformères de fibres d' α -Syn de type F de la protéine α -Syn (α -Syn) des conformères de fibres d' α -Syn de type R, et en ce qu'il comprend une séquence spécifique d'acide ribonucléique (ARN) modifié ayant au moins 85% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :6 et SEQ ID NO :7, de préférence choisie parmi SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2. Selon un mode de réalisation préféré, l'ARN a été modifié afin d'augmenter sa résistance vis-à-vis des nucléases ARN, de préférence en modifiant les riboses des pyrimidines de l'aptamère pour qu'ils portent un atome de fluor sur le carbone en position 2'.
- [0024] La présente invention concerne en outre une composition ou un kit comprenant au moins de ces aptamères, ainsi que leurs utilisations. La présente invention porte également sur une méthode de diagnostic de maladies neurodégénératives ainsi qu'une méthode de stratification, de suivi, de pronostic et d'évaluation de l'efficacité d'un traitement d'une synucléinopathie, comprenant l'utilisation d'au moins un aptamère et/ou une composition et/ou un kit susmentionné.

Description détaillée de l'invention

Résumé de l'invention

- [0025] La présente invention concerne un aptamère caractérisé en ce qu'il possède la capacité de distinguer les conformères de fibres d' α -Syn de type F de la protéine α -Syn (α -Syn) des conformères de fibres d' α -Syn de type R, et en ce qu'il comprend une séquence spécifique d'acide ribonucléique (ARN) modifié ayant au moins 85% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :6, et SEQ ID NO :7, de préférence choisie parmi SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2.
- [0026] Selon un mode de réalisation de l'aptamère selon l'invention, la constante de dissociation $K_{d(F)}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F est :
- [0027] a) inférieure à la constante de dissociation $K_{d(R)}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type R, de préférence inférieure d'au moins 10 fois ;
- [0028] b) inférieure à la constante de dissociation $K_{d(Mono)}$ mesurée pour les monomères d' α -Syn, de préférence inférieure d'au moins 2 fois ;

- [0029] c) inférieure à la constante de dissociation $K_{d(\text{Aléatoire})}$ d'un aptamère aléatoire mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F, de préférence inférieure d'au moins 2 fois ;
- [0030] d) inférieure à la constante de dissociation $K_{d(\text{R})}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type R, de préférence inférieure d'au moins 10 fois ; et inférieure à la constante de dissociation $K_{d(\text{Mono})}$ mesurée pour les monomères d' α -Syn, de préférence inférieure d'au moins 2 fois ;
- [0031] e) inférieure à la constante de dissociation $K_{d(\text{R})}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type R, de préférence inférieure d'au moins 10 fois ; et inférieure à la constante de dissociation $K_{d(\text{Aléatoire})}$ d'un aptamère aléatoire mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F, de préférence inférieure d'au moins 2 fois ;
ou
- [0032] f) inférieure à la constante de dissociation $K_{d(\text{R})}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type R, de préférence inférieure d'au moins 10 fois ; inférieure à la constante de dissociation $K_{d(\text{Mono})}$ mesurée pour les monomères d' α -Syn, de préférence inférieure d'au moins 2 fois ; et inférieure à la constante de dissociation $K_{d(\text{Aléatoire})}$ d'un aptamère aléatoire mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F, de préférence inférieure d'au moins 2 fois.
- [0033] Selon un mode de réalisation de l'aptamère selon l'invention, au moins une constante de dissociation K_d est comme suit :
- [0034] a. la constante de dissociation $K_{d(\text{F})}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F est inférieure à 15 nM, de préférence inférieure à 10 nM ;
et/ou
- b. la constante de dissociation $K_{d(\text{R})}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type R est supérieure à 100 nM, de préférence supérieure à 150 nM.
- [0035] La présente invention concerne en outre un aptamère tel que ci-dessus, comprenant en outre :
- [0036] i. en 5' de la séquence spécifique, une séquence amorce d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :29 et SEQ ID NO :30, de préférence située à l'extrémité 5' de la séquence spécifique ; et/ou
- ii. en 3' de la séquence spécifique, une séquence amorce d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :31, SEQ ID NO :32 et SEQ ID NO :33, de préférence située à l'extrémité 3' de la séquence spécifique.

- [0037] La présente invention concerne en outre un aptamère tel que ci-dessus, comprenant une séquence d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, SEQ ID NO :36, SEQ ID NO :37, SEQ ID NO :38, SEQ ID NO :39, et SEQ ID NO :40, de préférence choisie parmi SEQ ID NO :34 et SEQ ID NO :35.
- [0038] La présente invention concerne également un kit comprenant au moins un aptamère selon l'invention.
- [0039] Selon un mode de réalisation du kit selon l'invention, le kit comprend en outre au moins un aptamère additionnel choisi parmi les aptamères comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :9, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :11, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :13, SEQ ID NO :14, SEQ ID NO :15 , SEQ ID NO :16 et SEQ ID NO :17 , SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :19, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :21, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :23, SEQ ID NO :24, SEQ ID NO :25, SEQ ID NO :26, SEQ ID NO :27, et SEQ ID NO :28 ;
- [0040] le kit comprenant de préférence en outre un aptamère comprenant une séquence aléatoire d'ARN modifié.
- [0041] Selon un mode de réalisation du kit selon l'invention, au moins un aptamère additionnel comprend en outre :
- [0042] i. en 5' de la séquence spécifique, une séquence amorce d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :29 et SEQ ID NO :30, de préférence située à l'extrémité 5' de la séquence spécifique ; et/ou
- ii. en 3' de la séquence spécifique, une séquence amorce d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :31, SEQ ID NO :32, et SEQ ID NO :33, de préférence située à l'extrémité 3' de la séquence spécifique.
- [0043] La présente invention concerne également un kit tel que ci-dessus, dans lequel au moins un aptamère additionnel est choisi parmi les aptamères comprenant une séquence d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :40, SEQ ID NO :41, SEQ ID NO :42, SEQ ID NO :43 , SEQ ID NO :44, SEQ ID NO :45, SEQ ID NO :46, SEQ ID NO :47, SEQ ID NO :48 et SEQ ID NO :49, SEQ ID NO :50, SEQ ID NO :51, SEQ ID NO :52 , SEQ ID NO :53, SEQ ID NO :54, SEQ ID NO :55, SEQ ID NO :56, SEQ ID NO :57, SEQ ID NO :58, SEQ ID NO :59, et SEQ ID NO :60.
- [0044] Selon un mode de réalisation du kit selon l'invention, le kit comprend au moins les

aptamères suivants :

- [0045] – aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :1,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :2,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :3 ,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :8,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :9,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :10 ,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :11,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :12 ,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :13 ,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :14,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :16,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :17, et
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :18;

[0046] le kit comprenant de préférence en outre un aptamère comprenant une séquence aléatoire d'ARN modifié.

[0047] Le kit selon l'invention est de préférence caractérisé en ce que, lorsque le kit comprend plusieurs aptamères, ceux-ci sont :

- [0048] a. tous dans une seule composition, ou
- b. répartis dans plusieurs compositions distinctes dans des récipients séparés, incluant le cas où chacun des aptamères est dans une composition distincte située dans un récipient séparé.

[0049] La présente invention concerne en outre un aptamère tel que ci-dessus ou un kit tel que ci-dessus, dans lequel l'ARN de l'aptamère ou de tous les aptamères du kit a été modifié afin d'augmenter sa résistance vis-à-vis des nucléases ARN, de préférence

dans lequel les riboses des pyrimidines de l'aptamère ou de tous les aptamères du kit portent un atome de fluor sur le carbone en position 2'.

[0050] La présente invention concerne également une utilisation *in vitro* d'au moins un aptamère selon l'invention, d'au moins un kit selon l'invention, ou d'une combinaison quelconque de ceux-ci, pour :

- [0051] a. détecter la présence ou l'absence d'au moins un conformère de fibres d' α -Syn de type F dans un échantillon biologique ;
- b. déterminer la quantité d'un conformère de fibres d' α -Syn de type F dans un échantillon biologique ;
- c. établir une empreinte moléculaire de conformères de fibres d' α -Syn, de préférence de fibres d' α -Syn de type F et R d' α -Syn, dans un échantillon biologique ;
- d. cribler des composés/molécules capables de détecter et/ou reconnaître d'un conformère de fibres d' α -Syn de type F, de préférence cribler des composés/molécules capables de discriminer les conformères de fibres d' α -Syn de type F des conformères de fibres d' α -Syn de type R ; ou
- e. une combinaison quelconque de a) à d).

[0052] La présente invention concerne également une méthode *in vitro* de diagnostic d'une synucléinopathie chez un sujet ayant au moins un symptôme de maladie neurodégénérative, comprenant :

[0053] a) la mise en contact d'un échantillon biologique du sujet avec au moins un aptamère selon l'invention, avec au moins un kit selon l'invention, ou avec une combinaison quelconque de ceux-ci;

[0054] b) la détection de la présence ou l'absence d'au moins un conformère de fibres d' α -Syn de type F, la quantification des conformères de fibres d' α -Syn de type F, l'établissement d'une empreinte moléculaire de conformères de fibres d' α -Syn (de préférence de fibres d' α -Syn de type F et R d' α -Syn), ou une combinaison quelconque de ceux-ci, dans l'échantillon biologique du sujet ; et

[0055] c) le diagnostic de la présence ou l'absence d'une synucléinopathie chez le sujet en fonction du résultat de l'étape b).

[0056] La présente invention concerne également une méthode *in vitro* de stratification d'une synucléinopathie, de pronostic d'une synucléinopathie, de suivi d'une synucléinopathie, ou d'évaluation de l'efficacité d'un traitement d'une synucléinopathie chez un sujet souffrant d'une synucléinopathie, comprenant :

[0057] a) la mise en contact d'un échantillon biologique du sujet avec au moins un aptamère selon l'invention, avec au moins un kit selon l'invention, ou avec une combinaison quelconque de ceux-ci ;

[0058] b) la détection de la présence ou l'absence d'au moins un conformère de fibres

d' α -Syn de type F, la quantification des conformères de fibres d' α -Syn de type F, l'établissement d'une empreinte moléculaire de conformères de fibres d' α -Syn (de préférence de fibres d' α -Syn de type F et R d' α -Syn), ou une combinaison quelconque de ceux-ci, dans l'échantillon biologique du sujet ; et

[0059] c) la stratification de la synucléinopathie, le pronostic de la synucléinopathie, le suivi de la synucléinopathie, l'évaluation de l'efficacité du traitement de la synucléinopathie, chez le sujet, en fonction du résultat de l'étape b);

[0060] dans laquelle synucléinopathie est de préférence choisie parmi la maladie de Parkinson (MP), la démence à corps de Lewy (DCL) et l'atrophie Multi-Systématisée (AMS), de préférence encore synucléinopathie est la DCL.

Définitions

[0061] Par « **α -Synucléine** » ou « **α -Syn** » ou « **α -syn** » ou « **alpha-Synucléine** » ou « **a-Synucléine** » on entend une phosphoprotéine de la famille des synucléines qui est abondante dans le cerveau humain. On en trouve aussi de petites quantités dans le cœur, les muscles et d'autres tissus. Dans le cerveau, l' α -Syn se trouve essentiellement à l'extrémité des cellules nerveuses (neurones) dans les terminaisons présynaptiques. La séquence protéique de référence pour la protéine α -Synucléine humaine est la séquence NCBI référencée sous le numéro P37840.1.

[0062] A l'état physiologique, la protéine α -Syn existe sous deux formes. Elle peut être soluble ou bien liée à une membrane. A l'état soluble dans le cytosol, l' α -Syn a une structure désordonnée (Fauvet et al., 2012). En présence de membrane lipidique, la partie N-terminale de l' α -Syn adopte une structure en hélice α qui permet son en- châssement au sein de membranes lipidiques (Eliezer et al., 2001). Lorsqu'elle est liée à une membrane de large diamètre (au moins 100 nm), l' α -Syn adopte la forme d'une grande hélice allongée (Trexler and Rhoades, 2009). Lorsqu'au contraire elle interagit avec des petites vésicules (et donc à forte courbure), l' α -Syn adopte une structure composée de deux petites hélice α (Chandra et al., 2003).

[0063] En cas de repliement anormal, l' α -Syn peut également adopter des conformations dites « pathologiques », riches en feuillettes- β . Ces conformations pathologiques ont une forte propension à former des agrégats fibrillaires (appelés « α -Syn fibrillaires » ou « fibres d' α -Syn ») qui sont retrouvés sous forme de dépôts intracellulaires dans les synucléinopathies (El-Agnaf et al., 1998a). Par « **α -Syn fibrillaire** » ou « **fibre d' α -Syn** » ou « **agrégat fibrillaire d' α -Syn** » ou « **agrégat d' α -Syn** », on entend une fibre (ou un agrégat, ou un assemblage) composée de nombreuses répétitions de protéines α -Syn anormalement repliées (notamment de 25 à plusieurs centaines de répétitions de protéine d' α -Syn anormalement repliées). Il s'agit donc d'un assemblage de plusieurs copies (de 25 à plusieurs centaines) de protéines α -Syn mal repliées (présentant un repliement anormal/pathologique/non natif). Ces fibres d' α -Syn se

forment par recrutement successif des protéines α -Syn, selon un mécanisme de propagation où une protéine d' α -Syn mal repliée transmet sa conformation erronée lorsqu'elle se lie à une autre protéine. Ces fibres insolubles peuvent se retrouver dans les corps de Lewy caractéristiques de certaines pathologies connues sous le nom de synucléinopathies, telles que la maladie de Parkinson (MP), la démence à corps de Lewy (DCL) et l'atrophie multisystématisée (AMS).

- [0064] Plusieurs formes de fibres d' α -Syn avec des conformations structurales distinctes ont été isolées et il a été mis en évidence qu'elles pourraient induire des synucléinopathies différentes. Ces différentes conformations sont appelées des conformères de fibres d' α -Syn.
- [0065] La protéine α -Syn peut subir une ou plusieurs modifications post-traductionnelles, tels que l'addition d'un groupe fonctionnel (par exemple choisi parmi l'acétylation, l'alkylation, la biotinylation, la carboxylation, la glutamylation, la glycylation, la glycosylation, l'hydroxylation, l'isoprénylation, la lipoylation, la phosphopantetheinylation, la phosphorylation, la ribosylation, la sulfatation, la sélélation, l'amidation, etc., et une combinaison quelconque de ceux-ci), l'addition de groupes peptidiques ou de protéines (à condition pour cette dernière que la protéine ajoutée ne soit pas une protéine α -Syn ; l'addition de groupes peptidiques ou de protéines est par exemple choisi parmi l'ubiquitination, la neddylation, la sumoylation, l'urmylation, etc., et une combinaison quelconque de ceux-ci), le changement de la nature chimique d'un acide aminé (par exemple choisi parmi la citrullination, la déamidation, etc., et une combinaison quelconque de ceux-ci), un changement structural (par exemple choisi parmi la formation de pont disulfure, etc.), et une combinaison quelconque de ceux-ci.
- [0066] Par « **conformère d' α -Syn** » ou « **conformère de fibres d' α -Syn** » on entend une configuration (conformation) structurale/spatiale spécifique formée par un agrégat de protéines α -Syn ayant un repliement anormal (c'est-à-dire une configuration structurale spécifique adoptée par l' α -Syn fibrillaire). Différents conformères de fibres d' α -Syn ont été identifiés tels que les conformères de fibres d' α -Syn de type F, R, 65 et 91. Les conformères de fibres d' α -Syn de type F, 65 et 91 ont une forme cylindrique, tandis que les conformères de fibres de type R ont une forme de rubans plats, les fibres 91 et 65 sont torsadées mais avec des pas d'hélices différents. Au sein de ces fibres, au moins une copie de la protéine α -Syn peut comprendre une ou plusieurs modifications post-traductionnelles telles que définies ci-dessus.
- [0067] Par « **fibre F** » ou « **conformère de fibres d' α -Syn de type F** » ou « **conformère de fibres de type F d' α -Syn** » on entend un agrégat de protéines α -Syn qui se présente sous une forme cylindrique, produisant 9 bandes lors de leur proteolyse ménagée par la protéinase K (exemple en [Fig.1] (Landureau et al., 2021)) et dont la rigidité à la flexion est d'environ $5.8 \cdot 10^{-26} \text{ N.m}^2$.

- [0068] Par « **fibre R** » ou « **conformères de fibres d'α-Syn de type R** » ou « **conformères de fibres de type R d'α-Syn** » on entend un agrégat de protéines α-Syn qui se présente sous la forme de rubans plats. Les fibres de type R sont plus aplaties que les fibres de type F. Elles produisent 3 bandes lors de leurs proteolyse ménagée par la protéinase K (exemple en [Fig.1] (Landureau et al., 2021)) et ont une rigidité à la flexion d'environ $1.4 \cdot 10^{-26}$ N.m².
- [0069] Par « **fibre 65** » ou « **conformère de fibres 65** » ou « **conformère de fibres 65 d'α-Syn** » on entend un agrégat de protéines α-Syn qui se présente sous la forme de torsades serrées. Elles ont une rigidité à la flexion d'environ $2.7 \cdot 10^{-26}$ N.m².
- [0070] Par « **fibre 91** » ou « **conformère de fibres 91** » ou « **conformère de fibres 91 d'α-Syn** » on entend un agrégat de protéines α-Syn qui se présente sous la forme de torsades lâches. Elles produisent 7 bandes lors de leurs proteolyse ménagée par la protéinase K (exemple en [Fig.1] (Landureau et al., 2021)) et ont une rigidité à la flexion d'environ $2.4 \cdot 10^{-26}$ N.m².
- [0071] Ces différents types de fibres peuvent être distingués à l'aide des différentes techniques d'analyses moléculaires et structurales connues de l'homme du métier, telles que l'analyse RMN du solide, la microscopie à force atomique, la microscopie électronique, la protéolyse ménagée, la diffraction des rayons X par les fibres, la fixation du ligand comme la Thioflavin T ou des anticorps, etc. Ces techniques ont notamment permis de montrer que les conformères de fibres F, R, 65 et 91 sont longues de 1 à 2 μm en moyenne, avec une largeur de l'ordre de 15 à 20 nm, les conformères de fibres d'α-Syn de type F étant les moins larges, et les conformères de fibres 65 les plus larges. Leur hauteur est de l'ordre de 5 à 7 nm, les conformères de fibres d'α-Syn de type R étant les moins hautes et les 65 les plus hautes. Enfin, les conformères de fibres 65 et 91 présentent des variations périodiques de la hauteur, à la différence des conformères de fibres d'α-Syn de type F et R. Alternativement ou en combinaison avec les techniques d'analyses moléculaires et structurales, ces différents types de conformères de fibres peuvent être distingués par leurs propriétés mécaniques, à l'aide des différentes techniques d'analyses mécaniques connues de l'homme du métier, telles que la microscopie à force atomique. Ces analyses mécaniques ont notamment permis de mettre en évidence que les quatre types de fibres avaient des propriétés mécaniques différentes. Ainsi, les conformères de fibres d'α-Syn de type F sont les plus rigides, avec une mesure de la résistance à la flexion quatre fois supérieure au conformère de fibre R et deux fois supérieure aux conformères de fibres 65 et 91. Les conformères de fibres d'α-Syn peuvent également être distingués les uns des autres (en particulier les conformères de fibres d'α-Syn peuvent être distingués des autres types de conformères de fibres d'α-Syn) par leur profil de dégradation par protéase. Leur différence structurale aboutit à des profils de dégradation qui sont

différents d'un conformère à une autre. Ces profils sont comparables à des codes barres (ou empreinte digitales) spécifiques à chaque conformère (voir un exemple de profil de dégradation en [Fig.1]). De plus, la forme entière de la protéine dans les conformères de fibres d' α -Syn de type F est plus résistante à la protéolyse que dans le conformère de type R (Fenyl et al., 2021).

- [0072] Au sein de ces fibres, au moins une copie de la protéine α -Syn peut comprendre une ou plusieurs modifications post-traductionnelles telles que définies ci-dessus.
- [0073] Par « **oligomère d' α -Syn** » ou « **α -Syn sous forme oligomérique** » on entend un assemblage comprenant plusieurs copies (entre 2 et 24) de la protéine de la protéine α -Syn, se présentant sous une forme de chaîne (c'est-à-dire une suite de protéines α -Syn liées/associées les unes aux autres, comprenant entre 2 et 24 protéines α -Syn). Un oligomère d' α -Syn se distingue d'une fibre d' α -Syn en ce qu'il comprend un nombre plus faible de copies d' α -Syn (Pieri et al., 2016). Un oligomère d' α -Syn comprend donc de 2 à une vingtaine de copies de la protéine α -Syn. Un oligomère d' α -Syn n'est pas une fibre d' α -Syn au sens de la présente invention, puisqu'il comprend moins de 25 monomères d' α -Syn.
- [0074] Par « **monomère d' α -Syn** » ou « **α -Syn sous forme monomérique** » on entend une molécule de la protéine α -Syn se présentant sous une forme libre, c'est-à-dire qui n'est pas liée/associée à une autre molécule de la protéine α -Syn. Un monomère d' α -Syn comprend donc une copie unique de la protéine α -Syn. Un monomère d' α -Syn se distingue donc des oligomères et des agrégats/fibres de la protéine α -Syn. La copie unique de la protéine α -Syn dans le monomère peut néanmoins comprendre une ou plusieurs modifications post-traductionnelles, telles que définies ci-dessus.
- [0075] Par « **aptamère** » on entend un oligonucléotide (c'est-à-dire un segment de chaîne d'acides nucléiques) qui adopte une structure tridimensionnelle lui conférant la capacité de se fixer spécifiquement sur un ligand donné (le ligand est appelé « cible »), notamment de nature protéique. Un aptamère est dit se lier de manière spécifique à une cible lorsqu'il ne présente essentiellement pas d'affinité pour un composé sans rapport structural avec la cible. De préférence, dans le cas d'une cible protéique, un composé protéique est dit sans rapport structural avec la cible selon l'invention, lorsque l'identité de séquence entre la cible et le composé est inférieure à 60%, de préférence inférieure à 70%, de préférence encore inférieure à 80%. De préférence, selon l'invention, un aptamère est dit ne présenter essentiellement pas d'affinité pour un composé selon l'invention, notamment lorsque la constante de dissociation de l'aptamère vis-à-vis du composé est supérieure à 10^{-6} mol/l, de préférence supérieure à 10^{-7} mol/l. La constante de dissociation peut notamment être déterminée, dans des conditions standards, à l'aide des représentations de Scatchard et de Lineweaver Burk bien connues de l'homme du métier.

- [0076] Les aptamères comprennent en général de quelques nucléotides à quelques dizaines de nucléotides, par exemple de 15 à 100 nucléotides (de préférence de 20 à 90 nucléotides, de préférence encore de 30 à 80 nucléotides, de préférence encore de 40 à 70 nucléotides, de préférence encore de 50 à 60 nucléotides). Les aptamères sont principalement fabriqués par voie synthétique, par des techniques connues de l'homme du métier (telles que la synthèse chimique ou enzymatique). Les aptamères sont généralement sélectionnés/identifiés par un processus d'évolution moléculaire dirigée nommé SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment).
- [0077] L'aptamère peut comprendre au moins un nucléotide modifié (c'est-à-dire un nucléotide qui n'est pas un nucléotide d'un ADN ou un ARN naturel). Ces nucléotides modifiés peuvent notamment être utilisés afin d'augmenter la résistance de l'aptamère à la dégradation par les nucléases. Ceci est particulièrement avantageux pour les aptamères ARN, généralement plus sensibles aux nucléases que les aptamères ADN. Un ARN comprenant au moins un nucléotide modifié est appelé ARN modifié.
- [0078] L'aptamère peut également comprendre au moins un groupement additionnel, en plus des nucléotides constitutifs de sa séquence d'acide nucléique. Ainsi, l'acide nucléique de l'aptamère peut être lié à au moins un groupement additionnel.
- [0079] Par « **ARN modifié** » on entend un ARN comportant au moins un nucléotide modifié. Un ARN modifié peut notamment être un ARN dans lequel le squelette de l'acide nucléique est modifié, en totalité ou en partie, en particulier pour le rendre résistant à une dégradation hydrolytique, en particulier du fait de l'action de nucléases. L'ARN peut être modifié en totalité (c'est à dire que chaque nucléotide qui le constitue est modifié) ou en partie (c'est à dire que seule une partie des nucléotides qui le constitue est modifié). Lorsque l'ARN est modifié en partie, on peut choisir de modifier tout ou partie des purines et/ou tout ou partie des pyrimidines.
- [0080] Les modifications d'un ARN (et/ou d'un nucléotide) sont bien connues de l'homme du métier et peuvent notamment être choisies parmi : la modification de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par méthylation ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement O-Méthoxyethyl; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement amino ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un halogène (notamment par le fluor) ; le remplacement du phosphodiester (PO) par un groupement phosphorothioate (PS) (on parle alors de squelette phosphorothioate) ; le recours à une structure de type acide nucléique bloqué (Locked Nucleic Acid, LNA), c'est-à-dire la formation d'un pont méthylène afin de verrouiller le ribose en conformation C3'-endo (N-type); le recours à une structure de type acide nucléique peptidique (Peptide Nucleic Acid, PNA), c'est-à-dire le remplacement du squelette sucre-phosphate par un squelette de type peptide ; et une combinaison

quelconque de ceux-ci.

[0081] Par « **groupement additionnel** » on entend un groupement chimique de tout type et de toute nature, ne faisant pas partie de la séquence nucléique de l'aptamère. Le groupement additionnel peut notamment être choisi parmi : un radioisotope, une molécule organique comprenant 100 atomes de carbone au plus, une nanoparticule, une protéine (notamment une glycoprotéine), un glucide, un lipide, un polynucléotide, et une combinaison quelconque de ceux-ci. Le groupement additionnel est de préférence choisi parmi : un marqueur détectable, un composé pharmacologique, un composé susceptible de modifier les caractéristiques pharmacocinétiques d'un acide nucléique auquel il est lié (tel que le polyéthylène glycol (PEG)), et une combinaison quelconque de ceux-ci.

[0082] Le marqueur détectable peut être de tout type, il peut notamment s'agir d'un fluorophore (par exemple la fluorescéine ou la luciférase), d'un radioisotope (notamment adapté à la scintigraphie, par exemple ^{99m}Tc), d'une étiquette reconnaissable par un anticorps (par exemple la protéine c-Myc ou une étiquette poly-histidine), d'une étiquette d'affinité (par exemple la biotine), d'une enzyme (par exemple la peroxydase de raifort), d'un agent de contraste, etc.

[0083] Le composé pharmacologique peut également être de tout type. Il peut notamment s'agir d'un agent de chimiothérapie anticancéreuse (tel qu'un agent cytostatique ou cytologique), d'un anticorps, d'une toxine, d'une hormone, d'une enzyme, d'un composé antiviral, d'un composé antibiotique, d'un composé antifongique, d'un composé antibactérien, etc.

[0084] Par « **séquence spécifique/cible d'un aptamère** » ou « **séquence spécifique/cible d'un aptamère** » on entend la partie (section/région/portion) de la séquence d'un aptamère qui est spécifique du ligand (de la cible) de l'aptamère, c'est-à-dire la séquence qui est propre à un aptamère spécifique. La séquence spécifique d'un aptamère varie d'un aptamère à l'autre (il s'agit donc d'une séquence variable, par opposition à des séquences constantes susceptibles d'être également présentes dans un aptamère). La séquence spécifique d'un aptamère se distingue donc des séquences amorces (ou séquences « constantes », ou séquences « aspécifiques ») susceptibles d'être également présentes dans un aptamère.

[0085] Par « **séquence amorce d'un aptamère** » ou « **séquence constante d'un aptamère** » on entend une partie (section/région/portion) de la séquence d'un aptamère qui est présente dans tous les aptamères qui ont été identifiés/sélectionnés par une même session (une même mise en œuvre) de la méthode de sélection utilisée (tel que le SELEX). Il s'agit en général de la séquence d'une amorce utilisée pour l'étape de PCR lors du SELEX. Un aptamère comprend donc généralement deux séquences amorces, l'une en 5' de la séquence spécifique/cible, et l'autre en 3' de la séquence spécifique/

cible, permettant ainsi l'amplification par PCR. Les séquences amorces d'un aptamère ne sont donc pas spécifiques/propres à l'aptamère.

[0086] Par « **séquence aléatoire** » on entend une séquence servant de contrôle et conçue de manière aléatoire par l'homme du métier (c'est-à-dire que les nucléotides qui la constituent sont assemblés au hasard). La séquence aléatoire a de préférence la même longueur que celle de l'aptamère. La séquence aléatoire a de préférence les mêmes séquences « constantes » (« amorces » ; de préférence en 3' et/ou en 5') que l'aptamère, le cas échéant. Dans ce cas, les séquences constantes encadrent la séquence aléatoire de l'aptamère (les séquences constantes sont donc en 5' et/ou en 3' de la séquence aléatoire de l'aptamère aléatoire) pour former un aptamère aléatoire dont la séquence complète a la même longueur que celle de l'aptamère selon l'invention ayant également des séquences constantes (identiques ou différentes de celles de l'aptamère aléatoire, de préférence identiques).

[0087] Par « **capacité de distinguer/discriminer au moins deux conformères de la protéine α -Synucléine (α -Syn) fibrillaire** » on entend la propriété que possède une molécule (par exemple un aptamère) lui permettant de se lier à au moins l'un des conformères de fibres d' α -Syn (tels que les conformères de fibres de type F, R, 91 et 61) avec une affinité significativement plus élevée (c'est à dire avec une constante de dissociation plus faible) qu'à au moins un autre conformère de fibres d' α -Syn. En particulier, une molécule est capable de distinguer au moins deux conformères de fibres d' α -Syn lorsqu'elle présente une affinité significativement plus forte pour un conformère de fibres d' α -Syn par rapport à l'autre conformère de fibres d' α -Syn. En d'autres termes, une molécule est capable de distinguer au moins deux conformères de fibres d' α -Syn lorsque qu'elle possède une capacité de liaison à un conformère de fibres d' α -Syn significativement supérieure à sa capacité de liaison à au moins un autre conformère de fibres d' α -Syn. Par exemple, la molécule est capable de distinguer au moins deux conformères de fibres d' α -Syn lorsque qu'elle présente une constante de dissociation significativement plus faible pour un conformère de fibres d' α -Syn que pour au moins un autre conformère de fibres d' α -Syn.

[0088] La molécule peut notamment être capable de distinguer au moins le conformère de fibres d' α -Syn de type F de la protéine α -Syn du conformère de fibres d' α -Syn de type R de la protéine α -Syn, si elle présente une affinité pour (une capacité de liaison à) le conformère de fibres d' α -Syn de type F significativement plus élevée que pour (qu'au) conformère de fibres d' α -Syn de type R. Par « **capacité de distinguer/discriminer le conformère de fibres d' α -Syn de type F de la protéine α -Syn du conformère de fibres d' α -Syn de type R** » on entend donc la propriété que possède une molécule lui permettant de se lier au conformère de fibres d' α -Syn de type F avec une affinité significativement plus élevée (c'est à dire avec une constante de dissociation plus faible)

qu'au conformère de fibres d' α -Syn de type R. Par exemple, la molécule est capable de distinguer le conformère de fibres d' α -Syn de type F du conformère de fibres d' α -Syn de type R lorsque que sa constante de dissociation moyenne (mesurée/calculée) pour le conformère de fibres d' α -Syn de type F est significativement inférieure à sa constante de dissociation moyenne (mesurée/calculée) pour le conformère de fibres d' α -Syn de type R. En particulier, une molécule est capable de distinguer le conformère de fibres d' α -Syn de type F du conformère de fibres d' α -Syn de type R lorsque qu'elle est capable de se lier au conformère de fibres d' α -Syn de type F mais pas au conformère de fibres d' α -Syn de type R.

[0089] La molécule peut notamment être capable de distinguer en outre le conformère de fibres d' α -Syn de type F de la protéine α -Syn des autres conformères de fibres de la protéine α -Syn (tels que le conformère de fibres 65 et le conformère de fibres 91, outre le conformère de fibres d' α -Syn de type R) ; et/ou la molécule peut notamment être capable de distinguer en outre le conformère de fibres d' α -Syn de type F de la protéine α -Syn des autres formes de la protéine α -Syn (tels que le monomère d' α -Syn et/ou des oligomères d' α -Syn). La définition donnée ci-dessus aux termes « **capacité de distinguer/discriminer le conformères de fibres d' α -Syn de type F de la protéine α -Syn du conformère de fibres d' α -Syn de type R** » s'applique alors, *mutatis mutandis*, à la capacité de distinguer le conformère de fibres d' α -Syn de type F du conformère de fibres 65 d' α -Syn, à la capacité de distinguer le conformère de fibres d' α -Syn de type F du conformère de fibres 91 d' α -Syn, à la capacité de distinguer le conformère de fibres d' α -Syn de type F du monomère d' α -Syn, et à la capacité de distinguer le conformère de fibres d' α -Syn de type F des oligomères d' α -Syn.

[0090] Par « **constante de dissociation à l'équilibre** » ou « **K_d** » ou « **K_d** » on entend la constante qui permet d'évaluer l'affinité entre deux molécules (par exemple entre un aptamère et une fibre de la protéine α -Syn). Cette affinité repose sur la nature, la géométrie et le nombre des interactions physicochimiques entre les deux molécules (interaction électrostatique, liaisons hydrogène, interaction de van der Waals et forces hydrophobes). Plus la valeur K_d est basse, plus l'affinité de liaison entre les deux molécules est élevée. Le K_d s'exprime en M (mol / l), souvent en nM ou pM.

[0091] Il existe plusieurs techniques permettant de déterminer/mesurer les constantes de dissociation, qui sont bien connues de l'homme du métier, telles qu'ELISA, les essais de retard sur gel, la filtration, la chromatographie, la thermophorèse, les essais « pull-down », la dialyse à l'équilibre, l'ultracentrifugation analytique, la résonance plasmonique de surface (RPS, ou SPR en anglais), les essais spectroscopiques, le titrage calorimétrique isotherme (ITC), la filtration sur membrane de nitrocellulose, etc. La constante de dissociation à l'équilibre peut notamment être déterminée, dans des conditions standards, à l'aide des représentations de Scatchard et de Lineweaver

Burk bien connues de l'homme du métier.

- [0092] Par « **maladie neurodégénérative** » ou « **MN** » on entend une pathologie dont la cause première est la mort des neurones. Les MNs désignent un groupe de pathologies aux symptômes cliniques très divers qui ont pour point commun d'être des maladies chroniques à évolution lente caractérisées par un dysfonctionnement et une mort progressive des cellules nerveuses (Gao and Hong, 2008). Les troubles induits par cette neurodégénérescence peuvent être d'ordre moteur, cognitif ou même sensoriel. Ils s'aggravent au fur et à mesure de l'évolution de la maladie et handicapent de manière croissante les patients. La fréquence des MNs augmente de manière importante avec l'âge. Or, en raison du vieillissement progressif de la population, le nombre de personnes souffrant de MNs a considérablement augmenté au cours des dernières décennies et devrait croître de manière régulière dans les années à venir (Heemels, 2016). Par exemple, l'Organisation mondiale de la Santé estime aujourd'hui à 50 millions le nombre de personnes souffrant de démence dans le monde, et prévoit 250 millions de patients à l'horizon 2050 (World Alzheimer Report, 2019; Naqvi, 2017). Les MNs sont des pathologies extrêmement invalidantes qui entraînent progressivement une perte d'autonomie des patients.
- [0093] Les MNs les plus connues sont : la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson (MP), la maladie de Huntington et la Sclérose latérale amyotrophique (SLA). Les MNs incluent notamment les synucléinopathies.
- [0094] Par « **synucléinopathie** » ou « **α -synucléinopathies** » ou « **alpha-synucléinopathies** » on entend une maladie neurodégénérative caractérisée par l'accumulation anormale d'agrégats de protéine α -Syn dans les neurones, les fibres nerveuses ou les cellules gliales. Les α -synucléinopathies sont des pathologies chroniques et progressives qui se manifestent par des troubles moteurs et cognitifs et des changements du comportement. Les synucléinopathies comprennent en particulier la maladie de Parkinson (MP), la démence à corps de Lewy (DCL) et l'atrophie multisystématisée (AMS). Ces trois maladies présentent notamment comme points communs la survenue de troubles du comportement en sommeil paradoxal, une dysautonomie et un syndrome parkinsonien asymétrique. Les synucléinopathies comprennent également des affections plus rares, telles que les différentes dystrophies neuroaxonales
- [0095] Par « **diagnostic** », on entend l'identification/la détermination d'une maladie, ou de l'absence d'une maladie, chez un sujet. Le diagnostic comprend par exemple la recherche des causes (étiologie) et des effets (symptômes) de la maladie, notamment sur la base d'observations et/ou de mesures, effectuées à l'aide de différents outils. Dans le cas des maladies neurodégénératives, les outils de diagnostic comprennent l'observation des troubles cognitifs, moteurs et sensoriels éprouvés par les patients et la détection/quantification de biomarqueurs génétiques et/ou biochimiques. Les bio-

marqueurs génétiques peuvent être des allèles ou des mutations dans le génome qui ont été identifiés comme prédisposant à la MN. Ce type de marqueurs permet ainsi d'identifier une population « à risque », qui a une plus forte probabilité de développer des MNs. Les marqueurs biochimiques sont des biomolécules dont la présence et/ou la quantité est corrélée à l'évolution de la pathologie (par exemple l'accumulation d'alpha-Synucléine pour les synucléinopathies).

- [0096] Par « **stratification** », on entend la séparation/classification de sujets en sous-groupes par sévérité/gravité de la maladie. Les différents sous-groupes comprennent notamment le sous-groupe des sujets sains ainsi que différents sous-groupes de sujets souffrant d'une maladie, classés en fonction du stade d'évolution/d'avancement de la maladie. On peut aussi stratifier les sujets en fonction du type de symptômes présents. Le stade d'évolution et les symptômes peuvent être déterminés sur la base d'observations et/ou de mesures, effectuées à l'aide de différents outils. Dans le cas des maladies neurodégénératives, les outils de stratification comprennent les outils qui sont également utilisés pour leur diagnostic.
- [0097] Par « **pronostic** », on entend la prédiction/la détermination/l'évaluation des risques d'évolution d'une maladie chez un sujet. Le pronostic comprend notamment l'évaluation du développement futur de l'état du sujet et des chances éventuelles d'amélioration voire de guérison. Le pronostic peut être déterminé sur la base d'observations et/ou de mesures, effectuées à l'aide de différents outils. Dans le cas des maladies neurodégénératives, les outils de pronostic comprennent les outils qui sont également utilisés pour leur diagnostic ou la stratification des sujets.
- [0098] Par « **suivi** », on entend la détermination/l'évaluation de l'évolution d'une maladie chez un sujet. Le suivi peut être réalisé sur la base d'observations et/ou de mesures, effectuées à l'aide de différents outils, à différents intervalles de temps. Les intervalles peuvent être réguliers ou irréguliers. Leur fréquence dépend de la maladie mais aussi du stade d'évolution de la maladie. Elle peut être de l'ordre de quelques jours (par exemple en cas de maladie à un stade sévère/avancé/grave et/ou en cas de maladie à évolution rapide et/ou en cas de phase d'exacerbation) à quelques années (par exemple en cas de maladie à un stade préliminaire, léger ou modéré, et/ou en cas de maladie à évolution lente). Dans le cas des maladies neurodégénératives, les outils de suivi comprennent les outils qui sont également utilisés pour le diagnostic ou le pronostic de la maladie, ou la stratification des sujets.
- [0099] Par « **évaluation de l'efficacité d'un traitement** », on entend la détermination de l'état clinique d'un sujet soumis à un traitement. Le traitement peut être préventif, par exemple en cas de prédisposition à une maladie, ou il peut être curatif, par exemple en cas de maladie diagnostiquée. L'efficacité du traitement peut par exemple être évaluée en déterminant l'état du sujet à différents intervalles de temps. L'état du sujet peut

notamment être évalué avant la première prise du traitement puis à des intervalles de temps réguliers (ou irréguliers) après cette première prise (par exemple après chaque nouvelle prise du traitement). Une comparaison de l'état du sujet évalué à ces différents intervalles peut alors être effectuée afin d'identifier un éventuel changement. Dans le cas d'un traitement curatif, une amélioration, une absence d'aggravation, ou une aggravation de l'état du patient inférieure à celle attendue en absence de traitement indique que le traitement est efficace, tandis qu'une aggravation de l'état du patient au moins égale à celle attendue en absence de traitement indique que le traitement n'est pas efficace. Dans le cas d'un traitement préventif, une absence d'apparition de la maladie ou une apparition plus tardive et/ou moins grave qu'attendue en l'absence de traitement indique que le traitement est efficace, tandis qu'une apparition aussi précoce et grave qu'attendue en l'absence de traitement indique que le traitement n'est pas efficace. L'état du patient peut être évalué sur la base d'observations et/ou de mesures, effectuées à l'aide de différents outils. Dans le cas des maladies neurodégénératives, les outils d'évaluation de l'efficacité d'un traitement comprennent les outils qui sont également utilisés pour le diagnostic, le pronostic ou le suivi de la maladie, ou la stratification des sujets.

[0100] Par « **stade d'une maladie neurodégénérative** » « **stade d'évolution d'une maladie neurodégénérative** » ou « **stade d'avancement d'une maladie neurodégénérative** », on entend une phase de la maladie neurodégénérative qui est déterminée selon la gravité des symptômes dont souffrent le sujet et leurs implications/conséquences sur le mode et/ou la qualité de vie du sujet. Ces stades peuvent être au nombre de quatre. Par exemple :

- [0101] – Au stade 1 (ou premier stade), on parle de maladie légère ou de stade léger.
- Au stade 2 (ou deuxième stade), on parle de maladie modérée ou de stade modéré.
- Au stade 3 (ou troisième stade), on parle de maladie sévère ou de stade sévère.
- Au stade 4 (ou quatrième stade), on parle de maladie très sévère ou de stade très sévère. La qualité de vie est, à ce stade, considérablement altérée.

[0102] Par « **aggravation** » ou « **phase d'aggravation** », on entend une période durant laquelle les signes cliniques d'une maladie neurodégénérative se majorent chez un sujet souffrant de ladite maladie.

[0103] Par « **sujet** » ou « **patient** », on entend un individu humain ou un animal différent d'un humain. Le sujet est par exemple un humain ou un animal susceptible d'être atteint d'une maladie neurodégénérative ou souffrant d'une telle maladie. Le sujet est de préférence un être humain. Le sujet peut être un enfant (sujet humain âgé de 16 ans ou moins) ou un adulte (sujet humain âgé de plus de 16 ans). Par « **sujet sain** » on entend un sujet qui ne souffre pas de la maladie considérée. Dans le cadre de la

présente invention, un sujet sain est de préférence un sujet qui ne souffre d'aucune maladie neurodégénérative, de préférence encore un sujet qui ne souffre d'aucune maladie. Par « **sujet de référence** » on entend un sujet qui souffre d'une maladie neurodégénérative connue (notamment une synucléinopathie, et en particulier une maladie de Parkinson (MP), une démence à corps de Lewy (DCL) ou une atrophie multisystématisée (AMS)), à un stade connu.

[0104] Par "**échantillon biologique**" ou "**prélèvement**" d'un sujet, on entend un organe entier ou un tissu ou une partie d'un tel organe ou tissu, un fluide ou une fraction d'un tel fluide, des cellules ou des composants cellulaires, obtenus de ce sujet, ainsi qu'un homogénat, un lysat ou un extrait préparé à partir de ceux-ci. En particulier, un "échantillon biologique" ou "prélèvement" est de préférence tout tissu (de préférence des portions ou fractions de celui-ci) qui peut contenir des neurones et/ou des protéines α -Syn, y compris, mais sans s'y limiter, un échantillon du système nerveux central (SNC), tel qu'un échantillon de cerveau ou un échantillon de moelle épinière, de glandes salivaires, du système digestif (par exemple le colon), du fluide cérébrospinal, du plasma, du sang, etc.

[0105] L'échantillon biologique peut avoir été préalablement obtenu par toute technique connue dans la profession. Ces techniques comprennent, par exemple, la chirurgie (telle que la chirurgie stéréotaxique), la ponction, l'explant, l'excision, la biopsie. Par "excision", on entend une procédure chirurgicale consistant à couper (exciser) une partie plus ou moins large ou profonde du tissu, de préférence une anomalie ou une croissance du tissu. Une excision peut être pratiquée pour enlever et/ou analyser une tumeur cancéreuse ou suspecte. Le terme "biopsie" désigne ici un échantillon de cellules ou de tissus prélevé pour analyse. Plusieurs types de procédures de biopsie sont connus et pratiqués sur le terrain. Les types les plus courants comprennent (1) la biopsie incisionnelle, dans laquelle seul un échantillon du tissu est prélevé ; (2) la biopsie excisionnelle (ou biopsie chirurgicale), qui consiste à retirer totalement une masse tumorale, réalisant ainsi une procédure thérapeutique et diagnostique ; et (3) la biopsie à l'aiguille, dans laquelle un échantillon de tissu est prélevé à l'aide d'une aiguille, qui peut être grosse ou fine. D'autres types de biopsie existent, comme les frottis ou le curetage, et peuvent également être utilisés pour obtenir l'échantillon. Par conséquent, l'échantillon peut être, par exemple, un explant, une excision, une biopsie, etc. L'échantillon est de préférence obtenu par une procédure peu invasive, telle que la chirurgie stéréotaxique.

[0106] Par « **identité** » ou « **identité de séquence** », on entend une correspondance exacte de séquence entre deux polypeptides ou acides aminés, ou entre deux molécules d'acides nucléiques ou oligonucléotides. Les pourcentages d'identité auxquels il est fait référence dans le cadre de l'exposé de la présente invention sont déterminés après

alignement global optimal des séquences à comparer, qui peuvent donc comprendre une ou plusieurs additions, délétions, troncatures et/ou substitutions. Ce pourcentage d'identité peut être calculé par toute méthode d'analyse de séquences bien connue de l'homme du métier. Le pourcentage d'identité est déterminé après alignement global des séquences à comparer prises dans leur intégralité, sur toute leur longueur. Outre manuellement, il est possible de déterminer l'alignement global de séquences au moyen de l'algorithme de Needleman et Wunsch (1970).

[0107] Notamment, pour les séquences nucléotidiques, la comparaison des séquences peut être effectuée à l'aide de tout logiciel bien connu de l'homme du métier, comme par exemple le logiciel Needle. Les paramètres utilisés peuvent notamment être les suivants : « *Gap Open* » égal à 10,0, « *Gap Extend* » égal à 0,5 et la matrice EDNAFULL (Version EMBOSS du NCBI NUC4.4).

[0108] Pour les séquences d'acides aminés, la comparaison des séquences peut être effectuée à l'aide de tout logiciel bien connu de l'homme du métier, comme par exemple le logiciel Needle. Les paramètres utilisés peuvent notamment être les suivants : « *Gap Open* » égal à 10,0, « *Gap Extend* » égal à 0,5 et la matrice BLOSUM62.

[0109] À titre illustratif, "au moins 80% d'identité de séquence", tel qu'utilisé ici, représente notamment 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% d'identité de séquence.

Aptamères

[0110] Dans le cadre de la présente invention, les Inventeurs ont mis au point des aptamères d'acide ribonucléique (ARN) modifié capables de reconnaître de manière spécifique certains conformères de fibres d' α -Syn. Les Inventeurs ont en effet sélectionné et isolé des aptamères ARN modifié ayant des affinités différentes pour différents conformères de fibre d' α -Syn.

[0111] Les Inventeurs ont notamment montré que, de manière surprenante, les aptamères mis au point sont capables de distinguer les conformères de fibres d' α -Syn de type F des conformères de fibres d' α -Syn de type R, à la différence des aptamères ADN contre l' α -Syn décrits dans l'art antérieur.

[0112] Les données montrent en particulier que les aptamères mis au point par les Inventeurs ont une forte affinité pour le conformère de fibres d' α -Syn de type F (constante de dissociation K_d entre 5 et 10 nM). De manière inattendue, ces aptamères présentent en revanche une affinité très faible voire nulle pour le conformère de fibres d' α -Syn de type R, ainsi que les conformères de fibre 65 et 91 d' α -syn. Les Inventeurs ont également mis en évidence que ces aptamères reconnaissent avec une affinité au moins 10 fois plus faible la protéine α -Syn sous forme native (forme monomérique, non fibrillaire). De façon remarquable, les Inventeurs ont développé une méthode utilisant un

mélange de ces aptamères qui permet de discriminer efficacement ces conformères de fibre par séquençage à haut-débit, applicables à des échantillons de patients.

[0113] Les données montrent que ces aptamères sont des outils de détection spécifique et sensible des différentes fibres d' α -Syn. La présente invention fournit donc à la fois des méthodes de diagnostic efficace et fiable des maladies neurodégénératives, des méthodes de criblage de molécules mais également des outils pour la recherche dans le domaine des maladies neurodégénératives.

[0114] Les aptamères présentent plusieurs avantages : 1) ils ont des affinités et une spécificité de reconnaissance pour leur cible comparables à celles des anticorps ; 2) étant des oligonucléotides, ils peuvent être utilisés dans de nombreuses techniques de biologie moléculaire (PCR quantitative, puce, rolling circle amplification, séquençage à haut-débit...) ; 3) ils sont faciles à synthétiser ou à amplifier in vitro ; 4) ils peuvent être couplés facilement à un grand nombre de composés ; 5) ils sont peu immunogènes ; 6) ils ne sont pas soumis aux problèmes de dénaturation pendant le stockage ; 7) ils sont très résistants aux changements de température ; 8) ils sont nettement moins chers que les anticorps.

[0115] La présente invention concerne donc un aptamère caractérisé en ce qu'il possède la capacité de distinguer au moins deux conformères de fibre de la protéine α -Synucléine (α -Syn), et en ce qu'il comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, une séquence spécifique d'acide ribonucléique (ARN) modifié ayant au moins 85% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :1 (séquence spécifique de l'aptamère N30), SEQ ID NO :2 (séquence spécifique de l'aptamère N124), SEQ ID NO :3 (séquence spécifique de l'aptamère N3), SEQ ID NO :4 (séquence spécifique de l'aptamère 4F02), SEQ ID NO :5 (séquence spécifique de l'aptamère 4F03), SEQ ID NO :6 (séquence spécifique de l'aptamère F124), et SEQ ID NO :7 (séquence spécifique de l'aptamère P65) ; de préférence choisie parmi SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :4, et SEQ ID NO :5 ; de préférence encore choisie parmi SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2.

[0116] La présente invention concerne en particulier un aptamère caractérisé en ce qu'il possède la capacité de distinguer les conformères de fibres d' α -Syn de type F de la protéine α -Syn (α -Syn) des conformères de fibres d' α -Syn de type R, et en ce qu'il comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, une séquence cible/spécifique d'acide ribonucléique (ARN) modifié ayant au moins 85% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :1 (séquence spécifique de l'aptamère N30), SEQ ID NO :2 (séquence spécifique de l'aptamère N124), SEQ ID NO :3 (séquence spécifique de l'aptamère N3), SEQ ID NO :4 (séquence spécifique de l'aptamère 4F02), SEQ ID NO :5 (séquence spécifique de l'aptamère 4F03), SEQ ID NO :6 (séquence spécifique de l'aptamère F124), et SEQ ID NO :7 (séquence spécifique de

l'aptamère P65) ; de préférence choisie parmi SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :4 et SEQ ID NO :5 ; de préférence encore choisie parmi SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2.

- [0117] Selon un mode de réalisation préféré, l'aptamère comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 86% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :6 et SEQ ID NO :7 ; de préférence choisie parmi SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :4 et SEQ ID NO :5 ; de préférence encore choisie parmi SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2. De préférence, l'aptamère comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 87% d'identité, de préférence encore au moins 88% d'identité, de préférence encore au moins 89% d'identité, de préférence encore au moins 90% d'identité, de préférence encore au moins 91% d'identité, de préférence encore au moins 92% d'identité, de préférence encore au moins 93% d'identité, de préférence encore au moins 94% d'identité, de préférence encore au moins 95% d'identité, de préférence encore au moins 96% d'identité, de préférence encore au moins 97% d'identité, de préférence encore au moins 98% d'identité, de préférence encore au moins 99% d'identité, avec une séquence spécifique d'ARN modifié choisie parmi SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :6 et SEQ ID NO :7; de préférence choisie parmi SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :4, et SEQ ID NO :5 ; de préférence encore choisie parmi SEQ ID NO :1, et SEQ ID NO :2. De manière particulièrement préférée, l'aptamère comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, une séquence spécifique d'ARN modifié choisie parmi SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :6, et SEQ ID NO :7; de préférence choisie parmi SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :4, et SEQ ID NO :5 ; de préférence encore choisie parmi SEQ ID NO :1, et SEQ ID NO :2.
- [0118] Les séquences SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :6 et SEQ ID NO :7 sont indiquées dans le **Tableau 1** ci-dessous.
- [0119] **Tableau 1** : Séquences spécifique des aptamères N30, N124, N3, 4F02, 4F03, F124 et P65.

[0120] [Tableaux1]

SEQ ID	Description	Séquence
SEQ ID NO :1	Séquence spécifique de l'aptamère N30	UCGAUCCACGUCCGACAACGCGUUUACUC GCCAUC
SEQ ID NO :2	Séquence spécifique de l'aptamère N124	UCCGACCAUGCUUCAACUUAUACCUCGGG GACUGU
SEQ ID NO :3	Séquence spécifique de l'aptamère N3	CAACGCGUUUACCUCACACCACGUCAUCCG UUGCC
SEQ ID NO :4	Séquence spécifique de l'aptamère 4F02	GCUGGCAGCACGCACCGCUGACCGCUGGC UGCACUAUGCGUGUGGAGUGC
SEQ ID NO :5	Séquence spécifique de l'aptamère 4F03	GCAACAGACGCACCGUACACACAUCUUGG CCGUUGGCUGCCCGACCAGCC
SEQ ID NO :6	Séquence spécifique de l'aptamère F124	CACGGACACCUACCCGACGGCAUGUCAGG ACACAUGUUGUGCUCGUGUG
SEQ ID NO :7	Séquence spécifique de l'aptamère P65	CGCACAGUGUACACCUACACACAGCAUAC CUGUUGGCAUCCAGGUUGCC

[0121] Selon un mode de réalisation, l'aptamère selon l'invention possède en outre la capacité de distinguer les conformères de fibres d' α -Syn de type F des monomères d' α -Syn. Selon un mode de réalisation alternatif ou en combinaison, l'aptamère selon l'invention possède en outre la capacité de distinguer les conformères de fibres d' α -Syn de type F des conformères de fibres 65 d' α -Syn et/ou de fibres 91 d' α -Syn. Selon un mode de réalisation alternatif ou en combinaison, l'aptamère selon l'invention possède en outre la capacité de distinguer les conformères de fibres d' α -Syn de type F des oligomères d' α -Syn. Ainsi, selon un mode de réalisation, l'aptamère selon l'invention possède la capacité de distinguer les conformères de fibres d' α -Syn de type F des conformères de fibres d' α -Syn de type R, ainsi que des conformères de fibres 65 d' α -Syn, des conformères de fibres 91 d' α -Syn, des oligomères d' α -Syn et des monomères d' α -Syn. Ainsi, selon un mode de réalisation avantageux, l'aptamère selon l'invention est spécifique les conformères de fibres d' α -Syn de type F. Selon un mode de réalisation, l'aptamère selon l'invention n'a aucune affinité pour les conformères de fibres d' α -Syn de type R, ainsi que pour les conformères de fibres 65 d' α -Syn, les conformères de fibres 91 d' α -Syn, et les monomères d' α -Syn.

[0122] Selon un mode de réalisation préféré, la constante de dissociation $K_{d(F)}$ de l'aptamère selon l'invention, mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F, est in-

fériorité (de préférence significativement inférieure) à la constante de dissociation $K_{d(R)}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type R, de préférence inférieure d'au moins 10 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 11 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 12 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 13 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 14 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 15 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 20 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 25 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 30 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 40 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 50 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 100 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 200 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 300 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 400 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 500 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 600 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 700 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 800 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 900 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 1000 fois. Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, l'affinité de l'aptamère selon l'invention pour les conformères de fibres d' α -Syn de type R est tellement faible que la constante de dissociation $K_{d(R)}$ ne peut pas être mesurée/déterminée en utilisant les méthodes usuelles de détermination des constantes de dissociation (telles que celles listées dans la section définition ci-dessus).

[0123] Selon un mode de réalisation préféré alternatif ou en combinaison avec le mode préféré ci-dessus, la constante de dissociation $K_{d(F)}$ de l'aptamère selon l'invention, mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F, est inférieure (de préférence significativement inférieure) à la constante de dissociation $K_{d(Mono)}$ mesurée pour les monomères d' α -Syn, de préférence inférieure d'au moins 2 fois, de préférence inférieure d'au moins 3 fois, de préférence inférieure d'au moins 4 fois, de préférence inférieure d'au moins 5 fois, de préférence inférieure d'au moins 6 fois, de préférence inférieure d'au moins 7 fois, de préférence inférieure d'au moins 8 fois, de préférence inférieure d'au moins 9 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 10 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 11 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 12 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 13 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 14 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 15 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 20 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 25 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 30 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 40 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 50 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 100 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 200 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 300 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 400 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 500

fois, de préférence encore inférieure d'au moins 600 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 700 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 800 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 900 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 1000 fois. Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, l'affinité de l'aptamère selon l'invention pour les monomères d' α -Syn est tellement faible que la constante de dissociation $K_{d(\text{mono})}$ ne peut pas être mesurée/déterminée en utilisant les méthodes usuelles de détermination des constantes de dissociation (telles que celles listées dans la section définition ci-dessus).

[0124] Selon un mode de réalisation préféré alternatif ou en combinaison avec un ou plusieurs des modes préférés ci-dessus, la constante de dissociation $K_{d(F)}$ de l'aptamère selon l'invention, mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F, est inférieure (de préférence significativement inférieure) à la constante de dissociation $K_{d(65)}$ mesurée pour les conformères de fibres 65 d' α -Syn, de préférence inférieure d'au moins 2 fois, de préférence inférieure d'au moins 3 fois, de préférence inférieure d'au moins 4 fois, de préférence inférieure d'au moins 5 fois, de préférence inférieure d'au moins 6 fois, de préférence inférieure d'au moins 7 fois, de préférence inférieure d'au moins 8 fois, de préférence inférieure d'au moins 9 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 10 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 11 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 12 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 13 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 14 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 15 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 20 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 25 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 30 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 40 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 50 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 100 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 200 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 300 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 400 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 500 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 600 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 700 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 800 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 900 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 1000 fois. Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, l'affinité de l'aptamère selon l'invention pour les conformères de fibres 65 d' α -Syn est tellement faible que la constante de dissociation $K_{d(65)}$ ne peut pas être mesurée/déterminée en utilisant les méthodes usuelles de détermination des constantes de dissociation (telles que celles listées dans la section définition ci-dessus).

[0125] Selon un mode de réalisation préféré alternatif ou en combinaison avec un ou plusieurs des modes préférés ci-dessus, la constante de dissociation $K_{d(F)}$ de l'aptamère selon l'invention, mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F, est inférieure (de préférence significativement inférieure) à la constante de dissociation $K_{d(91)}$

mesurée pour les conformères de fibres 91 d' α -Syn, de préférence inférieure d'au moins 2 fois, de préférence inférieure d'au moins 3 fois, de préférence inférieure d'au moins 4 fois, de préférence inférieure d'au moins 5 fois, de préférence inférieure d'au moins 6 fois, de préférence inférieure d'au moins 7 fois, de préférence inférieure d'au moins 8 fois, de préférence inférieure d'au moins 9 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 10 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 11 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 12 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 13 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 14 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 15 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 20 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 25 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 30 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 40 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 50 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 100 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 200 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 300 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 400 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 500 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 600 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 700 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 800 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 900 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 1000 fois. Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, l'affinité de l'aptamère selon l'invention pour les conformères de fibres 91 d' α -Syn est tellement faible que la constante de dissociation $K_{d(91)}$ ne peut pas être mesurée/déterminée en utilisant les méthodes usuelles de détermination des constantes de dissociation (telles que celles listées dans la section définition ci-dessus).

[0126] Selon un mode de réalisation préféré alternatif ou en combinaison avec un ou plusieurs des modes préférés ci-dessus, la constante de dissociation $K_{d(F)}$ de l'aptamère selon l'invention, mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F, est inférieure (de préférence significativement inférieure) à la constante de dissociation $K_{d(\text{Aléatoire})}$ d'un aptamère aléatoire (c'est-à-dire un aptamère comprenant une séquence aléatoire d'ARN modifié, de préférence tel que défini ci-dessous dans la section « composition et kits ») mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F, de préférence inférieure d'au moins 2 fois, de préférence inférieure d'au moins 3 fois, de préférence inférieure d'au moins 4 fois, de préférence inférieure d'au moins 5 fois, de préférence inférieure d'au moins 6 fois, de préférence inférieure d'au moins 7 fois, de préférence inférieure d'au moins 8 fois, de préférence inférieure d'au moins 9 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 10 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 11 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 12 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 13 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 14 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 15 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 20 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 25 fois, de préférence encore

inférieure d'au moins 30 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 40 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 50 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 100 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 200 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 300 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 400 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 500 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 600 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 700 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 800 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 900 fois, de préférence encore inférieure d'au moins 1000 fois. Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, l'affinité de l'aptamère aléatoire pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F est tellement faible que la constante de dissociation $K_{d(\text{aléatoire})}$ ne peut pas être mesurée/déterminée en utilisant les méthodes usuelles de détermination des constantes de dissociation (telles que celles listées dans la section définition ci-dessus).

[0127] Avantageusement, la constante de dissociation $K_{d(F)}$ mesurée, notamment en utilisant les méthodes usuelles de détermination des constantes de dissociation (telles que celles listées dans la section définition ci-dessus), pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F, est inférieure à 50 nM, de préférence encore inférieure à 40 nM, de préférence encore inférieure à 30 nM, de préférence encore inférieure à 25 nM, de préférence encore inférieure à 20 nM, de préférence encore inférieure à 18 nM, de préférence encore inférieure à 16 nM, de préférence encore inférieure à 14 nM, de préférence encore inférieure à 13 nM, de préférence encore inférieure à 12 nM, de préférence encore inférieure à 11 nM, de préférence encore inférieure à 10 nM, de préférence encore inférieure à 9 nM, de préférence encore inférieure à 8 nM, de préférence encore inférieure à 7 nM.

[0128] Avantageusement, la constante de dissociation $K_{d(R)}$ mesurée, notamment en utilisant les méthodes usuelles de détermination des constantes de dissociation (telles que celles listées dans la section définition ci-dessus), pour les conformères de fibres d' α -Syn de type R, est supérieure à 100 nM, de préférence encore supérieure à 150 nM, de préférence encore supérieure à 200 nM, de préférence encore supérieure à 300 nM, de préférence encore supérieure à 400 nM, de préférence encore supérieure à 500 nM, de préférence encore supérieure à 600 nM, de préférence encore supérieure à 700 nM, de préférence encore supérieure à 800 nM, de préférence encore supérieure à 900 nM, de préférence encore supérieure à 1000 nM. Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, l'affinité de l'aptamère selon l'invention pour les conformères de fibres d' α -Syn de type R est tellement faible que la constante de dissociation $K_{d(R)}$ ne peut pas être mesurée/déterminée en utilisant les méthodes usuelles de détermination des constantes de dissociation (telles que celles listées dans la section définition ci-dessus).

[0129] Selon un mode de réalisation préféré, l'aptamère selon l'invention a au moins une constante de dissociation K_d comme suit :

- [0130] a. la constante de dissociation $K_{d(F)}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F est inférieure à 15 nM, de préférence inférieure à 10 nM ; et/ou
- b. la constante de dissociation $K_{d(R)}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type R est supérieure à 100 nM, de préférence supérieure à 500 nM.

[0131] La constante de dissociation K_d d'un aptamère est par exemple mesurée en utilisant les méthodes usuelles de détermination des constantes de dissociation, de préférence choisie parmi celles listées dans la section définition ci-dessus, de préférence encore par filtration, de préférence encore par filtration sur membrane de nitrocellulose.

[0132] Selon un mode de réalisation préféré, l'aptamère selon l'invention comprend en outre :

- [0133] i. en 5' de la séquence spécifique, une séquence amorce 5' d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 86% d'identité, de préférence au moins 87% d'identité, de préférence au moins 88% d'identité, de préférence au moins 89% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 91% d'identité, de préférence au moins 92% d'identité, de préférence au moins 93% d'identité, de préférence au moins 94% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, de préférence au moins 96% d'identité, de préférence au moins 97% d'identité, de préférence au moins 98% d'identité, de préférence au moins 99% d'identité, de préférence 100% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :29 (séquence amorce P72 des aptamères N, en 5'), et SEQ ID NO :30 (séquence amorce P73 des aptamères 4F, F, R et P, en 5'), de préférence située à l'extrémité 5' de la séquence spécifique ; et/ou
- ii. en 3' de la séquence spécifique, une séquence amorce 3' d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 86% d'identité, de préférence au moins 87% d'identité, de préférence au moins 88% d'identité, de préférence au moins 89% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 91% d'identité, de préférence au moins 92% d'identité, de préférence au moins 93% d'identité, de préférence au moins 94% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, de préférence au moins 96% d'identité, de préférence au moins 97% d'identité, de préférence au moins 98% d'identité, de préférence au moins 99% d'identité, de préférence 100% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :31 (amorce PiRT en 3'), SEQ ID NO :32 (Séquence G de 24 nts en 3'), et SEQ

ID NO :33 (PiRT-G ; combinaison amorce PiTR + séquence G, en 3'), de préférence située à l'extrémité 3' de la séquence spécifique.

[0134] Selon le mode de réalisation i. ci-dessus, l'aptamère se présente sous la forme « Amorce 5' – Séquence spécifique » (dans le sens 5' – 3' de la séquence d'ARN modifié). Selon le mode de réalisation ii. ci-dessus en relation avec l'amorce de SEQ ID NO :31, l'aptamère se présente sous la forme « Séquence spécifique - Amorce 3' » (dans le sens 5' – 3' de la séquence d'ARN modifié). Selon le mode de réalisation i. combiné au mode de réalisation ii. ci-dessus en relation avec l'amorce de SEQ ID NO :31, l'aptamère se présente sous la forme « Amorce 5' – Séquence spécifique - Amorce 3' » (dans le sens 5' – 3' de la séquence d'ARN modifié), cette dernière forme étant nommée ci-après « séquence complète de l'aptamère » (ou « séquence combinée de l'aptamère »).

[0135] Les séquences SEQ ID NO :29 à SEQ ID NO :33 sont indiquées dans le **Tableau 2** ci-dessous.

[0136] **Tableau 2** : Séquences des amorces 3' et 5' d'ARN modifié des aptamères.

[0137] [Tableaux2]

SEQ ID	Description	Séquence
SEQ ID NO :29	Séquence amorce P72 des aptamères N, en 5'	GGGAGAGUAUCCGUUGAG GCUGA
SEQ ID NO :30	Séquence amorce P73 des aptamères 4F, F, R et P, en 5'	GGGAGAGUAUCCGUUGGA GGCAU
SEQ ID NO :31	Séquence amorce PiRT en 3'	AGAUCGGAAGAGCGUCGU GUAGG
SEQ ID NO :32	Séquence G de 24 nts en 3'	GCAUUGCCCCAGCGUGACU GCCUA
SEQ ID NO 33	Séquence PiRT-G : combinaison amorce PiTR + séquence G, en 3'	AGAUCGGAAGAGCGUCGU GUAGG GCAUUGCCCCAGC- GUGACUGCCUA

[0138] Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, l'aptamère selon l'invention comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, une séquence complète d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :34 (séquence complète de l'aptamère N30, avec amorces 5' et 3', mais sans séquence G), SEQ ID NO :35 (séquence complète de l'aptamère N124), SEQ ID NO :36 (séquence complète de l'aptamère N3), SEQ ID NO :37 (séquence complète de l'aptamère 4F02), SEQ ID NO :38 (séquence complète de l'aptamère

4F03), SEQ ID NO :39 (séquence complète de l'aptamère F124), et SEQ ID NO :40 (séquence complète de l'aptamère P65), de préférence choisie parmi SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, SEQ ID NO :37, et SEQ ID NO :38 ; de préférence encore choisie parmi SEQ ID NO :34 et SEQ ID NO :35.

[0139] Selon un mode de réalisation préféré, l'aptamère comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, une séquence complète d'ARN modifié ayant au moins 86% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, SEQ ID NO :36, SEQ ID NO :37, SEQ ID NO :38, SEQ ID NO :39, et SEQ ID NO :40 ; de préférence choisie parmi SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, SEQ ID NO :37, et SEQ ID NO :38 ; de préférence encore choisie parmi SEQ ID NO :34 et SEQ ID NO :35. De préférence l'aptamère comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, une séquence complète d'ARN modifié ayant au moins 87% d'identité, de préférence encore au moins 88% d'identité, de préférence encore au moins 89% d'identité, de préférence encore au moins 90% d'identité, de préférence encore au moins 91% d'identité, de préférence encore au moins 92% d'identité, de préférence encore au moins 93% d'identité, de préférence encore au moins 94% d'identité, de préférence encore au moins 95% d'identité, de préférence encore au moins 96% d'identité, de préférence encore au moins 97% d'identité, de préférence encore au moins 98% d'identité, de préférence encore au moins 99% d'identité, avec une séquence complète d'ARN modifié choisie parmi SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, SEQ ID NO :36, SEQ ID NO :37, SEQ ID NO :38, SEQ ID NO :39, et SEQ ID NO :40 ; de préférence choisie parmi SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, SEQ ID NO :37, et SEQ ID NO :38 ; de préférence encore choisie parmi SEQ ID NO :34 et SEQ ID NO :35. De manière particulièrement préférée l'aptamère comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, une séquence complète d'ARN modifié choisie parmi SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, SEQ ID NO :36, SEQ ID NO :37, SEQ ID NO :38, SEQ ID NO :39, et SEQ ID NO :40 ; de préférence choisie parmi SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, SEQ ID NO :37, et SEQ ID NO :38 ; de préférence encore choisie parmi SEQ ID NO :34 et SEQ ID NO :35.

[0140] Les séquences SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, SEQ ID NO :36, SEQ ID NO :37, SEQ ID NO :38, SEQ ID NO :39, et SEQ ID NO :40 sont indiquées dans le **Tableau 3** ci-dessous.

[0141] **Tableau 3** : Séquence complète des aptamères N30, N124, N3, 4F02, 4F03, F124 et P65.

[0142] [Tableaux3]

SEQ ID	Description	Séquence
SEQ ID NO :34	Séquence complète de l'aptamère N30	GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAUCGAUCCACGUCC GACAACGCGUUUACUCGCCAUCAGAUCGGAAGAGCG UCGUGUAGG
SEQ ID NO :35	Séquence complète de l'aptamère N124	GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAUCGACCAUGCUU CAACUUAUACCUCGGGGACUGUAGAUCGGAAGAGCG UCGUGUAGG
SEQ ID NO :36	Séquence complète de l'aptamère N3	GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGACAACGCGUUUACC UCACACCACGUCAUCCGUUGCCAGAUCGGAAGAGCG UCGUGUAGG
SEQ ID NO :37	Séquence complète de l'aptamère 4F02	GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUGCUGGCAGCACGC ACCGCUGACCGCUGGCUGCACUAUGCGUGUGGAGUG CAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :38	Séquence complète de l'aptamère 4F03	GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUGCAACAGACGCAC CGUACACACAUCUUGGCCGUUGGCUGCCCGACCAGC CAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :39	Séquence complète de l'aptamère F124	GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUCACGGACACCUAC CCGACGGCAUGUCAGGACACAUGUUGUGCUCGUGU GAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :40	Séquence complète de l'aptamère P65	GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUCGCACAGUGUAC ACCUACACACAGCAUACCUGUUGGCAUCCAGGUUG CCAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG

[0143] L'aptamère selon l'invention peut en outre comprendre, en 3' de la séquence complète « Amorce 5' – Séquence spécifique - Amorce 3' » telle que définie ci-dessus, une séquence amorce 3' d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 86% d'identité, de préférence au moins 87% d'identité, de préférence au

moins 88% d'identité, de préférence au moins 89% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 91% d'identité, de préférence au moins 92% d'identité, de préférence au moins 93% d'identité, de préférence au moins 94% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, de préférence au moins 96% d'identité, de préférence au moins 97% d'identité, de préférence au moins 98% d'identité, de préférence au moins 99% d'identité, de préférence 100% d'identité, avec SEQ ID NO :32, de préférence située à l'extrémité 3' de l'aptamère. Selon ce mode de réalisation, l'aptamère se présente sous la forme « Amorces 5' – Séquence spécifique - Amorces 3' – Séquence G » (dans le sens 5' – 3' de la séquence d'ARN modifié), cette forme étant nommée ci-après « séquence complète G de l'aptamère » (ou séquence combinée G de l'aptamère).

[0144] Selon un mode de réalisation préféré, l'ARN de l'aptamère selon l'invention (c'est-à-dire de n'importe quel aptamère tel que décrit ci-dessus, y compris la séquence spécifique de l'aptamère, la séquence des amorces 5' et/ou 3', la séquence complète de l'aptamère, et la séquence complète G de l'aptamère) a été modifié afin d'augmenter sa résistance vis-à-vis des nucléases ARN. Avantageusement, l'ARN de l'aptamère selon l'invention a été modifié par au moins une modification choisie parmi : la modification de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par méthylation ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement O-Méthoxyethyl; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement amino ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un halogène (notamment par le fluor) ; le remplacement du phosphodiester (PO) par un groupement phosphorothioate (PS) (on parle alors de squelette phosphorothioate) ; le recours à une structure de type acide nucléique bloqué (Locked Nucleic Acid, LNA), c'est-à-dire la formation d'un pont méthylène afin de verrouiller le ribose en conformation C3'-endo (N-type); le recours à une structure de type acide nucléique peptidique (Peptide Nucleic Acid, PNA), c'est-à-dire le remplacement du squelette sucre-phosphate par un squelette de type peptide ; et une combinaison quelconque de ceux-ci. L'ARN de l'aptamère selon l'invention a été de préférence modifié par au moins une modification choisie parmi la modification de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par méthylation ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement O-Méthoxyethyl; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement amino ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un halogène (notamment par le fluor); et une combinaison quelconque de ceux-ci. Selon un mode de réalisation particulièrement préféré de l'aptamère selon l'invention, les riboses des pyrimidines portent un atome de fluor sur le carbone en position 2'.

[0145] Ainsi, de manière préférée, l'ARN modifié de l'aptamère selon l'invention est un ARN dont les riboses des nucléotides de pyrimidines (nucléotides de pyrimidiques) portent un atome de fluor sur le carbone en position 2', de préférence dans lequel les riboses des nucléotides de purines (nucléotides puriques) sont inchangées (il s'agit donc d'un ARN 2'Fluoro-pyrimidines (ARN2'F-Py)).

[0146] Selon un mode de réalisation, l'aptamère selon l'invention comprend en outre au moins un groupement additionnel tel que défini ci-dessus dans la partie « Définitions ». Le groupement additionnel peut être ajouté à n'importe quel nucléotide de l'aptamère. Le(s) groupement(s) additionnel(s) est(sont) de préférence situé(s) à l'extrémité 3' de l'aptamère, ou à l'extrémité 5' de l'aptamère, ou à l'extrémité 3' et à l'extrémité 5' de l'aptamère.

Compositions et kits

[0147] Les Inventeurs ont mis au point des aptamères ayant une forte affinité pour le conformère de fibres d' α -Syn de type F (constante de dissociation K_d entre 5 et 10 nM). De manière inattendue, ces aptamères présentent en revanche une affinité très faible voire nulle pour le conformère de fibres d' α -Syn de type R, ainsi que les conformères de fibres 65 et 91 d' α -syn. Les Inventeurs ont également mis en évidence que ces aptamères reconnaissent avec une affinité au moins 10 fois plus faible la protéine α -Syn sous forme native (forme monomérique, non fibrillaire). De façon remarquable, les Inventeurs ont développé une méthode utilisant un mélange de ces aptamères qui permet de discriminer efficacement ces conformères de fibre par séquençage à haut-débit, applicables à des échantillons de patients.

[0148] La présente invention concerne donc une composition comprenant, ou consistant essentiellement en, au moins un aptamère selon l'invention (tel que défini ci-dessus).

[0149] La présente invention concerne en outre un kit comprenant, ou consistant essentiellement en, au moins un aptamère selon l'invention (tel que défini ci-dessus).

[0150] Selon un mode de réalisation, la composition ou le kit comprend en outre au moins un aptamère additionnel choisi parmi les aptamères comprenant, ou consistant essentiellement en, ou consistant en, une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :8 (séquence spécifique de l'aptamère N0), SEQ ID NO :9 (séquence spécifique de l'aptamère N1), SEQ ID NO :10 (séquence spécifique de l'aptamère N2), SEQ ID NO :11 (séquence spécifique de l'aptamère N4), SEQ ID NO :12 (séquence spécifique de l'aptamère N5), SEQ ID NO :13 (séquence spécifique de l'aptamère N15), SEQ ID NO :14 (séquence spécifique de l'aptamère N20), SEQ ID NO :15 (séquence spécifique de l'aptamère N37), SEQ ID NO :16 (séquence spécifique de l'aptamère N62) et SEQ ID NO :17 (séquence spécifique de l'aptamère N73), SEQ ID NO :18 (séquence spécifique de l'aptamère N164), SEQ ID NO :19 (séquence spécifique de l'aptamère 4F01), SEQ ID

NO :20 (séquence spécifique de l'aptamère 4F04), SEQ ID NO :21 (séquence spécifique de l'aptamère 4F05), SEQ ID NO :22 (séquence spécifique de l'aptamère R01), SEQ ID NO :23 (séquence spécifique de l'aptamère R02), SEQ ID NO :24 (séquence spécifique de l'aptamère R03), SEQ ID NO :25 (séquence spécifique de l'aptamère R04), SEQ ID NO :26 (séquence spécifique de l'aptamère R05), SEQ ID NO :27 (séquence spécifique de l'aptamère R84), et SEQ ID NO :28 (séquence spécifique de l'aptamère P91) ;

[0151] la composition ou le kit comprenant de préférence en outre au moins un aptamère comprenant une séquence aléatoire d'ARN modifié.

[0152] Selon un mode de réalisation préféré, l'aptamère additionnel comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 86% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :9, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :11, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :13, SEQ ID NO :14, SEQ ID NO :15, SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :17, SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :19, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :21, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :23, SEQ ID NO :24, SEQ ID NO :25, SEQ ID NO :26, SEQ ID NO :27, et SEQ ID NO :28. De préférence l'aptamère additionnel comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 87% d'identité, de préférence encore au moins 88% d'identité, de préférence encore au moins 89% d'identité, de préférence encore au moins 90% d'identité, de préférence encore au moins 91% d'identité, de préférence encore au moins 92% d'identité, de préférence encore au moins 93% d'identité, de préférence encore au moins 94% d'identité, de préférence encore au moins 95% d'identité, de préférence encore au moins 96% d'identité, de préférence encore au moins 97% d'identité, de préférence encore au moins 98% d'identité, de préférence encore au moins 99% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :9, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :11, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :13, SEQ ID NO :14, SEQ ID NO :15, SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :17, SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :19, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :21, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :23, SEQ ID NO :24, SEQ ID NO :25, SEQ ID NO :26, SEQ ID NO :27, et SEQ ID NO :28. De manière particulièrement préférée, l'aptamère additionnel comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, une séquence spécifique d'ARN modifié choisie parmi SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :9, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :11, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :13, SEQ ID NO :14, SEQ ID NO :15, SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :17, SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :19, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :21, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :23, SEQ ID NO :24, SEQ ID NO :25, SEQ ID NO :26, SEQ ID NO :27, et SEQ ID NO :28.

[0153] Les séquences SEQ ID NO :8 à 28 sont indiquées dans le **Tableau 4** ci-dessous.

[0154] **Tableau 4** : Séquences spécifique des aptamères additionnels N0, N1, N2, N4, N5,

N15, N20, N37, N62 N73, N164, 4F01, 4F04, 4F05, R01, R02, R03, R04, R05, R84 et
P91

[0155] [Tableaux4]

SEQ ID	Description	Séquence
SEQ ID NO :8	Séquence spécifique de l'aptamère N0	UCAGUCCAGUACGAGACGCGUUUACCUCCACUGC A
SEQ ID NO :9	Séquence spécifique de l'aptamère N1	AUCCGACCAACCCAACGCGUUUACCUCACCUGCA
SEQ ID NO :10	Séquence spécifique de l'aptamère N2	UUCCGACCGCCGCAACUUAUAGGUAUCCCGCUGC A
SEQ ID NO :11	Séquence spécifique de l'aptamère N4	ACGCGUUUACUCCGCUAGUACGAACCCGAUUGCC C
SEQ ID NO :12	Séquence spécifique de l'aptamère N5	AGCCAUGCUGUCAACUUUUAACUCGUCACCGCUC G
SEQ ID NO :13	Séquence spécifique de l'aptamère N15	AUCGGCCACAGUCGACAACUUUGAAAUCCACCUG C
SEQ ID NO :14	Séquence spécifique de l'aptamère N20	GCAGCACAUGACCUCACCUUUUACUCUGCGCUGC A
SEQ ID NO :15	Séquence spécifique de l'aptamère N37	UCAGUCCAGCACCAACGCCGUUUGCUCUCGACUA C
SEQ ID NO :16	Séquence spécifique de l'aptamère N62	GUUUCCGAACGGCCCAACUUUGAAAUCCCGCCC G
SEQ ID	Séquence	CAACUUUGAAAUCCCAACCCUGCAGCCGUGUCUGG

NO :17	spécifique de l'aptamère N73	U
SEQ ID NO :18	Séquence spécifique de l'aptamère N164	GUUUCCGACCACGACCCAACGUUACUGCCCACCA C
SEQ ID NO :19	Séquence spécifique de l'aptamère 4F01	AGCAGCACACGACCAGUGUGCCCCACACCCAGUG GUGGUCUGUGGUGUGC
SEQ ID NO :20	Séquence spécifique de l'aptamère 4F04	CCGUCCACCAGACCAACGUACAAACUCCGCUGGU GGUCGCCUACCCUGGC
SEQ ID NO :21	Séquence spécifique de l'aptamère 4F05	GCCGCAGGCUACACCACAGCUUCCCCUUCAGCGU GUUGUGGAUACUCGGC
SEQ ID NO :22	Séquence spécifique de l'aptamère R01	UGCCGCACUACAGCUUGGUCUGCAUAUCCUCUGC GCACAGCUCCAUGUGC
SEQ ID NO :23	Séquence spécifique de l'aptamère R02	GCACGAUGUCCAUGACCAACUCCAGUCACGGCCC UGCAGCGUUAGGCUGU
SEQ ID NO :24	Séquence spécifique de l'aptamère R03	CCAGCAUCACCAGCGGCACGACGUCGGACGGCUG GCUGGUCCGUCACCGU
SEQ ID NO :25	Séquence spécifique de l'aptamère R04	GCAGAGCUACACGGUGCAAGUAGCACGUCCUGCC AUGCAUGCAGUGCUGC
SEQ ID	Séquence	CGGGAAGCAGCACGACGGCCUCA AUGCACUUGCC

NO :26	spécifique de l'aptamère R05	GGUUGGUUUCGGCUGC
SEQ ID NO :27	Séquence spécifique de l'aptamère R84	CUGCGAAGUGCCCAAGACCAUAUCCACUGCACAC GACAGCUGAUGGUGGC
SEQ ID NO :28	Séquence spécifique de l'aptamère P91	GCUACACACACAUCGCACGUCACCCACUAUGGGG ACAUCUUGCGGCGUGC

[0156] Selon un mode de réalisation, au moins un aptamère additionnel de la composition ou du kit selon l'invention comprend en outre :

- [0157] i. en 5' de la séquence spécifique, une séquence amorce 5' d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 86% d'identité, de préférence au moins 87% d'identité, de préférence au moins 88% d'identité, de préférence au moins 89% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 91% d'identité, de préférence au moins 92% d'identité, de préférence au moins 93% d'identité, de préférence au moins 94% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, de préférence au moins 96% d'identité, de préférence au moins 97% d'identité, de préférence au moins 98% d'identité, de préférence au moins 99% d'identité, de préférence 100% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :29 (séquence amorce P72 des aptamères N, en 5') et SEQ ID NO :30 (séquence amorce P73 des aptamères 4F, F, R et P, en 5'), de préférence située à l'extrémité 5' de la séquence spécifique ; et/ou
- ii. en 3' de la séquence spécifique, une séquence amorce 3' d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 86% d'identité, de préférence au moins 87% d'identité, de préférence au moins 88% d'identité, de préférence au moins 89% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 91% d'identité, de préférence au moins 92% d'identité, de préférence au moins 93% d'identité, de préférence au moins 94% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, de préférence au moins 96% d'identité, de préférence au moins 97% d'identité, de préférence au moins 98% d'identité, de préférence au moins 99% d'identité, de préférence 100% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :31 (amorce PiRT en 3'), SEQ ID NO :32 (Séquence G de 24 nts en 3') et SEQ ID

NO :33 (PiRT-G ; combinaison amorce PiTR + séquence G, en 3'), de préférence située à l'extrémité 3' de la séquence spécifique.

- [0158] Selon le mode de réalisation i. ci-dessus, l'aptamère additionnel se présente sous la forme « Amorce 5' – Séquence spécifique aptamère additionnel » (dans le sens 5' – 3' de la séquence d'ARN modifié). Selon le mode de réalisation ii. ci-dessus en relation avec l'amorce de SEQ ID NO :31, l'aptamère additionnel se présente sous la forme « Séquence spécifique aptamère additionnel - Amorce 3' » (dans le sens 5' – 3' de la séquence d'ARN modifié). Selon le mode de réalisation i. combiné au mode de réalisation ii. ci-dessus en relation avec l'amorce de SEQ ID NO :31, l'aptamère additionnel se présente sous la forme « Amorce 5' – Séquence spécifique aptamère additionnel - Amorce 3' » (dans le sens 5' – 3' de la séquence d'ARN modifié), cette dernière forme étant nommée ci-après « séquence complète de l'aptamère additionnel » (ou séquence combinée de l'aptamère additionnel).
- [0159] Les séquences SEQ ID NO :29 à SEQ ID NO :33 sont indiquées dans le **Tableau 2** ci-dessus.
- [0160] Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, au moins un aptamère additionnel de la composition ou du kit selon l'invention est choisi parmi les aptamères comprenant, ou consistant essentiellement en, ou consistant en, une séquence complète d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :41 (séquence complète de l'aptamère N0, avec amorces 5' et 3', mais sans séquence G), SEQ ID NO :42 (séquence complète de l'aptamère N1), SEQ ID NO :43 (séquence complète de l'aptamère N2), SEQ ID NO :44 (séquence complète de l'aptamère N4), SEQ ID NO :45 (séquence complète de l'aptamère N5), SEQ ID NO :46 (séquence complète de l'aptamère N15), SEQ ID NO :47 (séquence complète de l'aptamère N20), SEQ ID NO :48 (séquence complète de l'aptamère N37), SEQ ID NO :49 (séquence complète de l'aptamère N62) et SEQ ID NO :50 (séquence complète de l'aptamère N73), SEQ ID NO :51 (séquence complète de l'aptamère N164), SEQ ID NO :52 (séquence complète de l'aptamère 4F01), SEQ ID NO :53 (séquence complète de l'aptamère 4F04), SEQ ID NO :54 (séquence complète de l'aptamère 4F05), SEQ ID NO :55 (séquence complète de l'aptamère R01), SEQ ID NO :56 (séquence complète de l'aptamère R02), SEQ ID NO :57 (séquence complète de l'aptamère R03), SEQ ID NO :58 (séquence complète de l'aptamère R04), SEQ ID NO :59 (séquence complète de l'aptamère R05), SEQ ID NO :60 (séquence complète de l'aptamère R84), et SEQ ID NO :61 (séquence complète de l'aptamère P91).
- [0161] Selon un mode de réalisation préféré, au moins un aptamère additionnel comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, une séquence complète d'ARN modifié ayant au moins 86% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :41, SEQ ID NO :42, SEQ ID NO :43, SEQ ID NO :44, SEQ ID NO :45, SEQ ID NO :46, SEQ

ID NO :47, SEQ ID NO :48, SEQ ID NO :49, SEQ ID NO :50, SEQ ID NO :51, SEQ ID NO :52, SEQ ID NO :53, SEQ ID NO :54, SEQ ID NO :55, SEQ ID NO :56, SEQ ID NO :57, SEQ ID NO :58, SEQ ID NO :59, SEQ ID NO :60, et SEQ ID NO :61. De préférence l'aptamère additionnel comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, une séquence complète d'ARN modifié ayant au moins 87% d'identité, de préférence encore au moins 88% d'identité, de préférence encore au moins 89% d'identité, de préférence encore au moins 90% d'identité, de préférence encore au moins 91% d'identité, de préférence encore au moins 92% d'identité, de préférence encore au moins 93% d'identité, de préférence encore au moins 94% d'identité, de préférence encore au moins 95% d'identité, de préférence encore au moins 96% d'identité, de préférence encore au moins 97% d'identité, de préférence encore au moins 98% d'identité, de préférence encore au moins 99% d'identité, avec une séquence complète d'ARN modifié choisie parmi SEQ ID NO :41, SEQ ID NO :42, SEQ ID NO :43, SEQ ID NO :44, SEQ ID NO :45, SEQ ID NO :46, SEQ ID NO :47, SEQ ID NO :48, SEQ ID NO :49, SEQ ID NO :50, SEQ ID NO :51, SEQ ID NO :52, SEQ ID NO :53, SEQ ID NO :54, SEQ ID NO :55, SEQ ID NO :56, SEQ ID NO :57, SEQ ID NO :58, SEQ ID NO :59, SEQ ID NO :60, et SEQ ID NO :61. De manière particulièrement préférée, au moins aptamère additionnel comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, une séquence complète d'ARN modifié choisie parmi SEQ ID NO :41, SEQ ID NO :42, SEQ ID NO :43, SEQ ID NO :44, SEQ ID NO :45, SEQ ID NO :46, SEQ ID NO :47, SEQ ID NO :48, SEQ ID NO :49, SEQ ID NO :50, SEQ ID NO :51, SEQ ID NO :52, SEQ ID NO :53, SEQ ID NO :54, SEQ ID NO :55, SEQ ID NO :56, SEQ ID NO :57, SEQ ID NO :58, SEQ ID NO :59, SEQ ID NO :60, et SEQ ID NO :61.

[0162] Les séquences SEQ ID NO :41 à 61 sont indiquées dans le **Tableau 5** ci-dessous.

[0163] **Tableau 5** : Séquence complète des aptamères additionnels N0, N1, N2, N4, N5, N15, N20, N37, N62 N73, N164, 4F01, 4F04, 4F05, R01, R02, R03, R04, R05, R84 et P91

[0164] [Tableaux5]

SEQ ID	Description	Séquence
SEQ ID NO :41	Séquence complète de l'aptamère N0	GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAUCAGUCCAGUA CGAGACGCGUUUACCUCCACUGCAAGAUCGGAAG AGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :42	Séquence complète de l'aptamère N1	GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAAUCCGACCAAC CCAACGCGUUUACCUCACCUGCAAGAUCGGAAGA GCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :43	Séquence complète de l'aptamère N2	GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAUUCCGACCGCC GCAACUUAUAGGUAUCCCGCUGCAAGAUCGGAAG AGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :44	Séquence complète de l'aptamère N4	GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAACGCGUUUACU CCGCUAGUACGAACCCGAUUGCCCAGAUUCGGAAG AGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :45	Séquence complète de l'aptamère N5	GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAAGCCAUGCUGU CAACUUUUAACUCGUCACCGCUCGAGAUCGGAAG AGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :46	Séquence complète de l'aptamère N15	GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAAUCGGCCACAG UCGACAACUUUGAAAUCCACCUGCAGAUCGGAAG AGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :47	Séquence complète de l'aptamère N20	GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAGCAGCACAUGA CCUCACCUUUUACUCUGCGCUGCAAGAUCGGAAG AGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :48	Séquence complète de l'aptamère N37	GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAUCAGUCCAGCA CCAACGCCGUUUGCUCUCGACUACAGAUCGGAAG AGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :49	Séquence complète de l'aptamère N62	GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAGUUUCCGAACG GCCCAACUUUGAAAUCCCCGCCCGAGAUCGGAAG AGCGUCGUGUAGG
SEQ ID	Séquence	GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGACAACUUGAAAU

NO :50	complète de l'aptamère N73	CCCAACCCUGCAGCCGUGUCUGGUAGAUCGGAAG AGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :51	Séquence complète de l'aptamère N164	GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAGUUCCGACCA CGACCCAACGUUACUGCCCACCACAGAUCGGAAG AGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :52	Séquence complète de l'aptamère 4F01	GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUAGCAGCACACG ACCAGUGUGCCCCACACCCAGUGGUGGUCUGUGG UGUGCAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :53	Séquence complète de l'aptamère 4F04	GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUCCGUCCACCAG ACCAACGUACAAACUCCGUGGUGGUCGCCUACC CUGGCAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :54	Séquence complète de l'aptamère 4F05	GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUGCCGCAGGCUA CACCACAGCUUCCCCUUCAGCGUGUUGUGGAUAC UCGGCAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :55	Séquence complète de l'aptamère R01	GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUUGCCGCACUAC AGCUUGGUCUGCAUAUCCUCUGCGCACAGCUCCA UGUGCAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :56	Séquence complète de l'aptamère R02	GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUGCACGAUGUCC AUGACCAACUCCAGUCACGGCCCUGCAGCGUUAG GCUGUAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :57	Séquence complète de l'aptamère R03	GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUCCAGCAUCACC AGCGGCACGACGUCGGACGGCUGGCUGGUCCGUC ACCGUAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :58	Séquence complète de l'aptamère R04	GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUGCAGAGCUACA CGGUGCAAGUAGCACGUCCUGCCAUGCAUGCAGU GCUGCAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG
SEQ ID	Séquence	GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUCGGGAAGCAGC

NO :59	complète de l'aptamère R05	ACGACGGCCUCAAUGCACUUGCCGGUUGGUUUCG GCUGCAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :60	Séquence complète de l'aptamère R84	GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUCUGCGAAGUGC CCAAGACCAUAUCCACUGCACACGACAGCUGAUG GUGGCAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :61	Séquence complète de l'aptamère P91	GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUGCACACACAC AUCGCACGUCACCCACUAUGGGGACAUCUUGCGG CGUGCAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG

[0165] Au moins un aptamère additionnel de la composition ou du kit selon l'invention peut en outre comprendre, en 3' de la séquence complète « Amorce 5' – Séquence spécifique aptamère additionnel - Amorce 3' » telle que définie ci-dessus, une séquence amorce 3' d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 86% d'identité, de préférence au moins 87% d'identité, de préférence au moins 88% d'identité, de préférence au moins 89% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 91% d'identité, de préférence au moins 92% d'identité, de préférence au moins 93% d'identité, de préférence au moins 94% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, de préférence au moins 96% d'identité, de préférence au moins 97% d'identité, de préférence au moins 98% d'identité, de préférence au moins 99% d'identité, de préférence 100% d'identité, avec SEQ ID NO :32, de préférence située à l'extrémité 3' de l'aptamère additionnel. Selon ce mode de réalisation, l'aptamère additionnel se présente sous la forme « Amorce 5' – Séquence spécifique aptamère additionnel - Amorce 3' – Séquence G » (dans le sens 5' – 3' de la séquence d'ARN modifié), cette forme étant nommée ci-après « séquence complète G de l'aptamère additionnel » (ou séquence combinée G de l'aptamère additionnel).

[0166] Selon un mode de réalisation préféré, l'ARN d'au moins un aptamère selon l'invention de la composition ou du kit selon l'invention a été modifié afin d'augmenter sa résistance vis-à-vis des nucléases ARN. Avantageusement, l'ARN d'au moins un aptamère selon l'invention de la composition ou du kit selon l'invention (de préférence l'ARN de tous les aptamères selon l'invention de la composition ou du kit selon l'invention) a été modifié par au moins une modification choisie parmi : la modification de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par méthylation ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement O-Méthoxyethyl; la substitution de la fonction OH sur le carbone en

position 2' du ribose par un groupement amino ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un halogène (notamment par le fluor) ; le remplacement du phosphodiester (PO) par un groupement phosphorothioate (PS) (on parle alors de squelette phosphorothioate) ; le recours à une structure de type acide nucléique bloqué (Locked Nucleic Acid, LNA), c'est-à-dire la formation d'un pont méthylène afin de verrouiller le ribose en conformation C3'-endo (N-type); le recours à une structure de type acide nucléique peptidique (Peptide Nucleic Acid, PNA), c'est-à-dire le remplacement du squelette sucre-phosphate par un squelette de type peptide ; et une combinaison quelconque de ceux-ci.

[0167] L'ARN d'au moins un aptamère selon l'invention de la composition ou du kit selon l'invention (de préférence l'ARN de tous les aptamères selon l'invention de la composition ou du kit selon l'invention) a été de préférence modifié par au moins une modification choisie parmi la modification de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par méthylation ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement O-Méthoxyethyl; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement amino ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un halogène (notamment par le fluor); et une combinaison quelconque de ceux-ci. Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, l'ARN d'au moins un aptamère selon l'invention de la composition ou du kit selon l'invention (de préférence l'ARN de tous les aptamères selon l'invention de la composition ou du kit selon l'invention) a été modifié de sorte que les riboses des nucléotides pyrimidines portent un atome de fluor sur le carbone en position 2'. Ainsi, de manière préférée, l'ARN modifié de l'aptamère selon l'invention de la composition ou du kit selon l'invention (de préférence l'ARN modifié de tous les aptamères selon l'invention de la composition ou du kit selon l'invention) est un ARN dont les riboses des nucléotides de pyrimidines (nucléotides de pyrimidiques) portent un atome de fluor sur le carbone en position 2', de préférence dans lequel les riboses des nucléotides de purines (nucléotides puriques) sont inchangées (il s'agit donc d'un ARN 2'Fluoro-pyrimidines (ARN2'F-Py)).

[0168] Selon un mode de réalisation préféré, l'ARN d'au moins un aptamère additionnel de la composition ou du kit selon l'invention a été modifié afin d'augmenter sa résistance vis-à-vis des nucléases ARN. Avantagusement, l'ARN d'au moins un aptamère additionnel de la composition ou du kit selon l'invention (de préférence l'ARN de tous les aptamères additionnels de la composition ou du kit selon l'invention) a été modifié par au moins une modification choisie parmi : la modification de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par méthylation ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement O-Méthoxyethyl; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement amino ; la

substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un halogène (notamment par le fluor) ; le remplacement du phosphodiester (PO) par un groupement phosphorothioate (PS) (on parle alors de squelette phosphorothioate) ; le recours à une structure de type acide nucléique bloqué (Locked Nucleic Acid, LNA), c'est-à-dire la formation d'un pont méthylène afin de verrouiller le ribose en conformation C3'-endo (N-type); le recours à une structure de type acide nucléique peptidique (Peptide Nucleic Acid, PNA), c'est-à-dire le remplacement du squelette sucre-phosphate par un squelette de type peptide ; et une combinaison quelconque de ceux-ci.

[0169] L'ARN d'au moins un aptamère additionnel de la composition ou du kit selon l'invention (de préférence l'ARN de tous les aptamères additionnels de la composition ou du kit selon l'invention) a été de préférence modifié par au moins une modification choisie parmi la modification de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par méthylation ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement O-Méthoxyethyl; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement amino ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un halogène (notamment par le fluor); et une combinaison quelconque de ceux-ci. Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, l'ARN d'au moins un aptamère additionnel de la composition ou du kit selon l'invention (de préférence l'ARN de tous les aptamères additionnels de la composition ou du kit selon l'invention) a été modifié de sorte que les riboses des nucléotides pyrimidines portent un atome de fluor sur le carbone en position 2'. Ainsi, de manière préférée, l'ARN modifié de l'aptamère additionnel de la composition ou du kit selon l'invention (de préférence l'ARN modifié de tous les aptamères additionnels de la composition ou du kit selon l'invention) est un ARN dont les riboses des nucléotides de pyrimidines (nucléotides de pyrimidiques) portent un atome de fluor sur le carbone en position 2', de préférence dans lequel les riboses des nucléotides de purines (nucléotides puriques) sont inchangées (il s'agit donc d'un ARN 2'Fluoro-pyrimidines (ARN2'F-Py)).

[0170] Avantageusement, l'ARN de tous les aptamères additionnels de la composition ou du kit selon l'invention a été modifié comme défini ci-dessus. De manière particulièrement préférée, l'ARN d'au moins un aptamère additionnel de la composition ou du kit selon l'invention (de préférence de tous les aptamères additionnels de la composition ou du kit selon l'invention) a été modifié de la même façon que l'ARN d'au moins un aptamère selon l'invention de la composition ou du kit selon l'invention (de préférence de tous les aptamères selon l'invention de la composition ou du kit selon l'invention).

[0171] Selon un mode de réalisation préféré, la composition ou le kit selon l'invention comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, au moins les aptamères

suivants :

- [0172] – aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :1 (séquence spécifique de l'aptamère N30),
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :2 (séquence spécifique de l'aptamère N124),
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :3 (séquence spécifique de l'aptamère N3),
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :8 (séquence spécifique de l'aptamère N0),
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité , avec SEQ ID NO :9 (séquence spécifique de l'aptamère N1),
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :10 (séquence spécifique de l'aptamère N2),
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :11 (séquence spécifique de l'aptamère N4),
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :12 (séquence spécifique de l'aptamère N5),
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :13 (séquence spécifique de l'aptamère N15),
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :14 (séquence spécifique de l'aptamère N20),
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :16 (séquence spécifique de l'aptamère N62),
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :17 (séquence spécifique de l'aptamère N73), et
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au

moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :18 (séquence spécifique de l'aptamère N164) ;

[0173] le kit ou la composition comprenant de préférence en outre au moins un aptamère comprenant une séquence aléatoire d'ARN modifié.

[0174] En effet, les Inventeurs ont montré qu'avec un tel assortiment d'aptamères, une empreinte moléculaire spécifique (une signature caractéristique ou encore un profil distinctif) peut être obtenue pour un échantillon biologique contenant différents conformères de la protéine α -Syn. Cette empreinte moléculaire spécifique peut être utilisée dans le diagnostic, le pronostic, la stratification ou encore le suivi de maladies neurodégénératives, notamment des synucléinopathies.

[0175] Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, la composition ou le kit selon l'invention comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, au moins les aptamères (c'est-à-dire un assortiment/mélange d'aptamère) comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 86% d'identité, de préférence au moins 87% d'identité, de préférence au moins 88% d'identité, de préférence au moins 89% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 91% d'identité, de préférence au moins 92% d'identité, de préférence au moins 93% d'identité, de préférence au moins 94% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, de préférence au moins 96% d'identité, de préférence au moins 97% d'identité, de préférence au moins 98% d'identité, de préférence au moins 99% d'identité, de préférence 100% d'identité, avec les séquences suivantes : SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :9, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :11, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :13, SEQ ID NO :14, SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :17, et SEQ ID NO :18 ;

[0176] le kit ou la composition comprenant de préférence en outre au moins un aptamère comprenant une séquence aléatoire d'ARN modifié.

[0177] Selon un mode de réalisation, au moins un aptamère de l'assortiment d'aptamères de la composition ou du kit selon l'invention comprend en outre :

[0178] i. en 5' de la séquence spécifique, une séquence amorce 5' d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 86% d'identité, de préférence au moins 87% d'identité, de préférence au moins 88% d'identité, de préférence au moins 89% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 91% d'identité, de préférence au moins 92% d'identité, de préférence au moins 93% d'identité, de préférence au moins 94% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, de préférence au moins 96% d'identité, de préférence au moins 97% d'identité, de préférence au moins 98% d'identité, de préférence au moins 99% d'identité, de préférence 100% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :29

(séquence amorce P72 des aptamères N, en 5') et SEQ ID NO :30 (séquence amorce P73 des aptamères 4F, F, R et P, en 5'), de préférence située à l'extrémité 5' de la séquence spécifique ; et/ou

- ii. en 3' de la séquence spécifique, une séquence amorce 3' d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 86% d'identité, de préférence au moins 87% d'identité, de préférence au moins 88% d'identité, de préférence au moins 89% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 91% d'identité, de préférence au moins 92% d'identité, de préférence au moins 93% d'identité, de préférence au moins 94% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, de préférence au moins 96% d'identité, de préférence au moins 97% d'identité, de préférence au moins 98% d'identité, de préférence au moins 99% d'identité, de préférence 100% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :31 (amorce PiRT en 3'), SEQ ID NO :32 (Séquence G de 24 nts en 3', cf page 128 de la thèse) et SEQ ID NO :33 (PiRT-G ; combinaison amorce PiTR + séquence G, en 3'), de préférence située à l'extrémité 3' de la séquence spécifique.

[0179] Ainsi, selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, la composition ou le kit selon l'invention comprend, ou consiste essentiellement en, ou consiste en, au moins les aptamères (c'est-à-dire un assortiment/mélange d'aptamère) comprenant une séquence complète d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 86% d'identité, de préférence au moins 87% d'identité, de préférence au moins 88% d'identité, de préférence au moins 89% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 91% d'identité, de préférence au moins 92% d'identité, de préférence au moins 93% d'identité, de préférence au moins 94% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, de préférence au moins 96% d'identité, de préférence au moins 97% d'identité, de préférence au moins 98% d'identité, de préférence au moins 99% d'identité, de préférence 100% d'identité, avec les séquences suivantes : SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, SEQ ID NO :36, SEQ ID NO :41, SEQ ID NO :42, SEQ ID NO :43, SEQ ID NO :44, SEQ ID NO :45, SEQ ID NO :46, SEQ ID NO :47, SEQ ID NO :49, SEQ ID NO :50, et SEQ ID NO :51 ;

[0180] le kit ou la composition comprenant de préférence en outre au moins un aptamère comprenant une séquence aléatoire d'ARN modifié.

[0181] Au moins un aptamère de l'assortiment d'aptamères de la composition ou du kit selon l'invention peut en outre comprendre, en 3' de la séquence complète « Amorce 5' – Séquence spécifique aptamère assortiment - Amorce 3' » telle que définie ci-dessus, une séquence amorce 3' d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 86% d'identité, de préférence au moins 87% d'identité, de

préférence au moins 88% d'identité, de préférence au moins 89% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 91% d'identité, de préférence au moins 92% d'identité, de préférence au moins 93% d'identité, de préférence au moins 94% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, de préférence au moins 96% d'identité, de préférence au moins 97% d'identité, de préférence au moins 98% d'identité, de préférence au moins 99% d'identité, de préférence 100% d'identité, avec SEQ ID NO :32, de préférence située à l'extrémité 3' de l'aptamère de l'assortiment. Selon ce mode de réalisation, l'aptamère de l'assortiment se présente sous la forme « Amorces 5' – Séquence spécifique aptamère assortiment - Amorces 3' – Séquence G » (dans le sens 5' – 3' de la séquence d'ARN modifié), cette forme étant nommée ci-après « séquence complète G de l'aptamère de l'assortiment » (ou séquence combinée G de l'aptamère de l'assortiment).

[0182] Selon un mode de réalisation, la composition ou le kit selon l'invention comprend en outre au moins un aptamère (aptamère appelé « aptamère aléatoire ») comprenant, ou consistant essentiellement en, ou consistant en, une séquence aléatoire d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 86% d'identité, de préférence au moins 87% d'identité, de préférence au moins 88% d'identité, de préférence au moins 89% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 91% d'identité, de préférence au moins 92% d'identité, de préférence au moins 93% d'identité, de préférence au moins 94% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, de préférence au moins 96% d'identité, de préférence au moins 97% d'identité, de préférence au moins 98% d'identité, de préférence au moins 99% d'identité, de préférence 100% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :62 (Scr-1), et SEQ ID NO :63 (Scr-2), de préférence avec SEQ ID NO :63.

[0183] Le **Tableau 6** montre les séquences SEQ ID NO :62 et SEQ ID NO :63.

[0184] **Tableau 6** : Séquences des aptamères aléatoires Scr-1 et Scr-2.

[0185] [Tableaux6]

SEQ ID	Description	Séquence
SEQ ID NO :62	Séquence aptamère aléatoire Scr-1	GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUAUCGUUCAGCG UGGGAUCUGCUACAACUCCUGAGUGCUACAUGUA CGAGAAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG
SEQ ID NO :63	Séquence aptamère aléatoire Scr-2	GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAUUCAACACCGU UUGACGUUCUUGGUAUCGGAAGACAGAUCGGAAG AGCGUCGUGUAGG

[0186] Selon un mode de réalisation préféré, l'ARN d'au moins un aptamère aléatoire de la

composition ou du kit selon l'invention a été modifié afin d'augmenter sa résistance vis-à-vis des nucléases ARN. Avantageusement, l'ARN d'au moins un aptamère aléatoire de la composition ou du kit selon l'invention (de préférence l'ARN de tous les aptamères aléatoires de la composition ou du kit selon l'invention) a été modifié par au moins une modification choisie parmi : la modification de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par méthylation ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement O-Méthoxyethyl; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement amino ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un halogène (notamment par le fluor) ; le remplacement du phosphodiester (PO) par un groupement phosphorothioate (PS) (on parle alors de squelette phosphorothioate) ; le recours à une structure de type acide nucléique bloqué (Locked Nucleic Acid, LNA), c'est-à-dire la formation d'un pont méthylène afin de verrouiller le ribose en conformation C3'-endo (N-type); le recours à une structure de type acide nucléique peptidique (Peptide Nucleic Acid, PNA), c'est-à-dire le remplacement du squelette sucre-phosphate par un squelette de type peptide ; et une combinaison quelconque de ceux-ci.

[0187] L'ARN d'au moins un aptamère aléatoire de la composition ou du kit selon l'invention (de préférence l'ARN de tous les aptamères aléatoires de la composition ou du kit selon l'invention) a été de préférence modifié par au moins une modification choisie parmi la modification de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par méthylation ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement O-Méthoxyethyl; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un groupement amino ; la substitution de la fonction OH sur le carbone en position 2' du ribose par un halogène (notamment par le fluor); et une combinaison quelconque de ceux-ci. Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, l'ARN d'au moins un aptamère aléatoire de la composition ou du kit selon l'invention (de préférence l'ARN de tous les aptamères aléatoires de la composition ou du kit selon l'invention) a été modifié de sorte que les riboses des nucléotides pyrimidines portent un atome de fluor sur le carbone en position 2'. Ainsi, de manière préférée, l'ARN modifié de l'aptamère aléatoire de la composition ou du kit selon l'invention est un ARN dont les riboses des nucléotides de pyrimidines (nucléotides de pyrimidiques) portent un atome de fluor sur le carbone en position 2', de préférence dans lequel les riboses des nucléotides de purines (nucléotides puriques) sont inchangées (il s'agit donc d'un ARN 2'Fluoro-pyrimidines (ARN2'F-Py)).

[0188] Avantageusement, l'ARN de tous les aptamères aléatoires de la composition ou du kit selon l'invention a été modifié comme défini ci-dessus. De manière particulièrement préférée, l'ARN d'au moins un aptamère aléatoire de la composition ou du kit selon l'invention (de préférence de tous les aptamères aléatoires de la composition

ou du kit selon l'invention) a été modifié de la même façon que l'ARN d'au moins un aptamère selon l'invention et/ou d'au moins un aptamère additionnel (tel que défini ci-dessus) de la composition ou du kit selon l'invention (de préférence de tous les aptamères selon l'invention et/ou de tous les aptamères additionnels de la composition ou du kit selon l'invention).

[0189] Selon un mode de réalisation, le kit selon l'invention est caractérisé en ce que, lorsque le kit comprend plusieurs aptamères, ceux-ci sont :

- [0190] a. tous dans une seule composition, ou
 b. répartis dans plusieurs compositions distinctes dans des récipients séparés, incluant le cas où chacun des aptamères est dans une composition distincte située dans un récipient séparé.

[0191] Selon un mode de réalisation, le kit selon l'invention comprend en outre une notice d'utilisation.

[0192] La composition ou le kit selon l'invention peut en outre comprendre un excipient (choisi par exemple parmi les supports, les solvants, les diluants, les adjuvants, les milieux de dispersion, les revêtements, les agents antibactériens et antifongiques, les agents d'absorption, et toute combinaison de ceux-ci), une solution tampon (choisie par exemple parmi Tris, Hepes, phosphate, sodium, et toute combinaison de ceux-ci), une solution d'ions divalents (choisis par exemple parmi les ions magnésium, calcium, sodium, potassium et toute combinaison de ceux-ci), une enzyme (choisie par exemple parmi les polymérases ADN, les polymérases ARN, les reverse-transcriptase, les ligases, et toute combinaison de celles-ci), des nucléotides, etc, et toute combinaison de ceux-ci. Dans le cas d'un kit, les excipients, solutions tampon, solution d'ions divalents, enzymes, nucléotides, etc., peuvent être chacun dans une composition distincte située dans un récipient séparé, ou peuvent être mélangés deux à deux ou plus dans des compositions distinctes dans des récipients séparés, ou tous dans une même composition. Ils peuvent également être mélangés avec un ou plusieurs aptamère du kit.

[0193] Des exemples non limitatifs d'excipients comprennent l'eau, le NaCl, les solutions salines, les solutions de saccharides (par exemple le glucose, le tréhalose, le saccharose, le dextrose, etc.), le Ringer lacté, les alcools, les huiles, les gélatines, les hydrates de carbone tels que le lactose, l'amylose ou l'amidon, les esters d'acides gras, l'hydroxyméthylcellulose, etc. (voir par exemple l'édition la plus récente de Remington : The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins).

[0194] La composition ou le kit selon l'invention peut en outre comprendre les composés nécessaires à l'amplification (*in vitro*) des conformères de fibres d' α -Syn de type F et/ou de type R. L'amplification des conformères de fibres peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier. De telles techniques comprennent notamment

les méthodes d'amplification cyclique de protéines mal repliées (PMCA, pour « protein misfolding cyclic amplification » en anglais), par exemple telle que décrites dans Fenyi et al., 2019. Ainsi, la composition ou le kit selon l'invention peut en outre comprendre une solution tampon adaptée à l'amplification des conformères de fibres d' α -Syn (choisie par exemple parmi Tris, Tris-HCl, Hepes, KCl, et toute combinaison de ceux-ci), et/ou des monomères d' α -Syn, etc.

Utilisations

- [0195] Dans le cadre de la présente invention, les Inventeurs ont mis au point des aptamères d'acide ribonucléique (ARN) modifié capables de distinguer les conformères de fibres d' α -Syn de type F des autres conformères de fibres d' α -Syn et des monomère d' α -Syn.
- [0196] Les données montrent en particulier ces aptamères sont des outils de détection spécifique et sensible des différentes fibres d' α -Syn. La présente invention fournit donc des aptamères utiles pour réaliser des criblages de molécules mais également des outils pour la recherche dans le domaine des maladies neurodégénératives.
- [0197] La présente invention concerne donc l'utilisation *in vitro* d'au moins un aptamère selon l'invention, d'au moins une composition selon l'invention, d'au moins un kit selon l'invention, ou d'une combinaison quelconque de ceux-ci, pour :
- [0198] a. détecter la présence ou l'absence d'au moins un conformère de fibres d' α -Syn de type F dans un échantillon biologique ;
- b. quantifier (i.e. déterminer la quantité d') un conformère de fibres d' α -Syn de type F dans un échantillon biologique ;
- c. établir une empreinte moléculaire de conformères de fibres d' α -Syn, de préférence de fibres d' α -Syn de type F et R d' α -Syn, dans un échantillon biologique ;
- d. cribler des composés/molécules capables de détecter et/ou reconnaître un conformère de fibres d' α -Syn de type F, de préférence cribler des composés/molécules capables de discriminer les conformères de fibres d' α -Syn de type F des conformères de fibres d' α -Syn de type R ; ou
- e. une combinaison quelconque de a) à d).
- [0199] L'utilisation *in vitro* pour a) détecter la présence ou l'absence d'au moins un conformère de fibres d' α -Syn de type F dans un échantillon biologique comprend de préférence les étapes suivantes :
- [0200] 1. la mise en contact d'un échantillon biologique avec au moins un aptamère selon l'invention, au moins une composition selon l'invention, au moins un kit selon l'invention, ou d'une combinaison quelconque de ceux-ci ;
2. la détection de la présence ou l'absence de l'aptamère fixé dans l'échantillon ;
3. la détermination de la quantité et/ou de la présence ou l'absence d'au moins un conformère d' α -syn, de préférence des conformères de fibres d' α -Syn de

type F dans l'échantillon biologique.

- [0201] Les méthodes de détection peuvent utiliser notamment les techniques ELISA, les essais de retard sur gel, la filtration (notamment la filtration sur membrane de nitro-cellulose), la chromatographie, la thermophorèse, les essais « pull-down », la dialyse à l'équilibre, l'ultracentrifugation analytique, la résonance plasmonique de surface (RPS, ou SPR en anglais), les essais spectroscopiques, le titrage calorimétrique isotherme (ITC), la PCR, la PCR quantitative, le séquençage (notamment le séquençage à haut-débit), les puces à ADN etc.
- [0202] L'utilisation *in vitro* pour b) quantifier (i.e. déterminer la quantité d') un conformère de fibres d' α -Syn de type F dans un échantillon biologique comprend de préférence les étapes suivantes :
- [0203] 1. la mise en contact d'un échantillon biologique avec au moins un aptamère selon l'invention, au moins une composition selon l'invention, au moins un kit selon l'invention, ou d'une combinaison quelconque de ceux-ci ;
2. la quantification de la quantité d'aptamère fixé dans l'échantillon ;
3. la détermination de la quantité d'au moins un conformère d' α -syn, de préférence des conformères de fibres d' α -Syn de type F dans l'échantillon biologique.
- [0204] Les méthodes de quantification peuvent utiliser notamment les techniques d'ELISA, les essais de retard sur gel, la filtration (notamment la filtration sur membrane de nitro-cellulose), la chromatographie, la thermophorèse, les essais « pull-down », la dialyse à l'équilibre, l'ultracentrifugation analytique, la résonance plasmonique de surface (RPS, ou SPR en anglais), les essais spectroscopiques, le titrage calorimétrique isotherme (ITC), de PCR, de PCR quantitative, de séquençage à haut-débit, de puce à ADN etc.
- [0205] L'utilisation *in vitro* pour c) établir une empreinte moléculaire (c'est-à-dire une signature caractéristique ou encore un profil distinctif) de conformères de fibres d' α -Syn, de préférence de fibres d' α -Syn de type F et R d' α -Syn, comprend de préférence les étapes suivantes :
- [0206] 1. la mise en contact d'un échantillon biologique avec au moins un aptamère selon l'invention, au moins une composition selon l'invention, au moins un kit selon l'invention, ou d'une combinaison quelconque de ceux-ci ;
2. la quantification de la quantité d'aptamère fixé dans l'échantillon ;
3. l'établissement d'une empreinte moléculaire de conformères de fibres d' α -Syn, de préférence de fibres d' α -Syn de type F et R d' α -Syn dans l'échantillon biologique.
- [0207] Les méthodes pour établir une empreinte moléculaire des conformères d' α -Syn, en particulier des conformères de fibres d' α -Syn de type F, comprennent notamment les techniques d'ELISA, les essais de retard sur gel, la filtration (notamment la filtration

sur membrane de nitrocellulose), la chromatographie, la thermophorèse, les essais « pull-down », la dialyse à l'équilibre, l'ultracentrifugation analytique, la résonance plasmonique de surface (RPS, ou SPR en anglais), les essais spectroscopiques, le titrage calorimétrique isotherme (ITC), de PCR, de PCR quantitative, de séquençage à haut-débit, de puce à ADN etc.

[0208] Dans le cadre de l'utilisation pour établir une empreinte moléculaire, on choisira de préférence une composition ou un kit selon l'invention comprenant au moins 2 aptamères, et en particulier une composition ou un kit comprenant un assortiment d'aptamères tel que défini ci-dessus.

[0209] L'utilisation *in vitro* pour d) cribler des composés/molécules capables de détecter et/ou reconnaître d'un conformère de fibres d' α -Syn de type F comprend de préférence les étapes suivantes :

- [0210]
1. la mise en contact d'au moins un composé/une molécule avec un échantillon de conformères de fibres d' α -Syn de type F et au moins un aptamère selon l'invention, au moins une composition selon l'invention, au moins un kit selon l'invention, ou d'une combinaison quelconque de ceux-ci ;
 2. la quantification de la quantité d'aptamère fixé dans l'échantillon ;
 3. la détermination de la capacité du composé à se lier aux conformères de fibres d' α -Syn de type F (donc à induire une perte d'affinité de l'aptamère), sur la base de la quantification de l'étape 2.

[0211] Les méthodes de quantification peuvent utiliser notamment les techniques d'ELISA, les essais de retard sur gel, la filtration (notamment la filtration sur membrane de nitrocellulose), la chromatographie, la thermophorèse, les essais « pull-down », la dialyse à l'équilibre, l'ultracentrifugation analytique, la résonance plasmonique de surface (RPS, ou SPR en anglais), les essais spectroscopiques, le titrage calorimétrique isotherme (ITC), de PCR, de PCR quantitative, de séquençage à haut-débit, de puce à ADN etc.

[0212] Selon un mode de réalisation, l'utilisation *in vitro* selon l'invention, (i.e. l'utilisation telle que décrite ci-dessus pour a) détecter la présence ou l'absence d'au moins un conformère de fibres d' α -Syn de type F dans un échantillon biologique, b) quantifier un conformère de fibres d' α -Syn de type F dans un échantillon biologique, c) établir une empreinte moléculaire de conformères de fibres d' α -Syn dans un échantillon biologique, d) cribler des composés/molécules capables de détecter et/ou reconnaître un conformère de fibres d' α -Syn de type F, et une combinaison quelconque de ceux-ci) comprend en outre une étape 1') réalisée avant l'étape 1), d'amplification (*in vitro*) des conformères de fibres d' α -Syn de type F et/ou de type R dans un échantillon biologique ou un échantillon de conformères de fibres d' α -Syn de type F. L'amplification des conformères de fibres peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier. De telles techniques comprennent notamment les méthodes

d'amplification cyclique de protéines mal repliées (PMCA, pour « protein misfolding cyclic amplification » en anglais), par exemple telle que décrites dans Fenyi et al., 2019.

Méthodes

- [0213] Les Inventeurs ont montré que les aptamères selon l'invention peuvent être utilisés comme des outils de diagnostic, de pronostic, de stratification ou encore de suivi de maladies neurodégénératives, notamment des synucléinopathies, ou encore d'évaluation de l'efficacité d'un traitement.
- [0214] Les données montrent en particulier qu'en utilisant un assortiment d'aptamères, une empreinte moléculaire spécifique (une signature caractéristique ou encore un profil distinctif) peut être obtenue pour un échantillon biologique contenant différents conformères de la protéine α -Syn. Cette empreinte moléculaire spécifique permet de distinguer les maladies neurodégénératives les unes des autres, notamment les synucléinopathies.
- [0215] La présente invention concerne donc une méthode *in vitro* de diagnostic d'une synucléinopathie chez un sujet ayant au moins un symptôme de maladie neurodégénérative, comprenant :
- [0216] a) la mise en contact d'un échantillon biologique du sujet (appelé échantillon (A)) avec au moins un aptamère selon l'invention, au moins une composition selon l'invention, au moins un kit selon l'invention, ou d'une combinaison quelconque de ceux-ci ;
- [0217] b) la détection de la présence ou l'absence d'au moins un conformère de fibres d' α -Syn de type F, la quantification des conformères de fibres d' α -Syn de type F, l'établissement d'une empreinte moléculaire de conformères de fibres d' α -Syn (de préférence de fibres d' α -Syn de type F et R d' α -Syn), ou une combinaison quelconque de ceux-ci, dans l'échantillon biologique du sujet ; et
- [0218] c) le diagnostic de la présence ou l'absence d'une synucléinopathie chez le sujet en fonction du résultat de l'étape b).
- [0219] Selon un mode de réalisation préféré, le sujet est atteint d'une synucléinopathie, si on détecte la présence d'au moins un conformère de fibres d' α -Syn de type F et/ou si on obtient une empreinte moléculaire spécifique à une synucléinopathie.
- [0220] Selon un mode de réalisation, la méthode comprend en outre une étape a') réalisée avant l'étape a), d'amplification (*in vitro*) des conformères de fibres d' α -Syn de type F et/ou de type R dans un échantillon biologique dudit sujet (appelé échantillon (A)). L'amplification des conformères de fibres peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier. De telles techniques comprennent notamment les méthodes d'amplification cyclique de protéines mal repliées (PMCA, pour « protein misfolding cyclic amplification » en anglais), par exemple telle que décrites dans Fenyi et al.,

2019.

- [0221] Selon un mode de réalisation alternatif ou en combinaison avec les modes de réalisation décrits ci-dessus, la méthode comprend en outre une étape b'') réalisée entre l'étape b) et l'étape c), de détection de la présence ou l'absence d'au moins un conformère de fibres d' α -Syn de type F, de quantification des conformères de fibres d' α -Syn de type F, d'établissement d'une empreinte moléculaire de conformères de fibres d' α -Syn (de préférence de fibres d' α -Syn de type F et R d' α -Syn), ou une combinaison quelconque de ceux-ci, dans un ou plusieurs échantillon(s) biologique(s) de sujet(s) de référence. Le(s) sujet(s) de référence comprend(ent) de préférence au moins un sujet de référence souffrant d'une synucléinopathie et optionnellement au moins un sujet de référence sain. Comme échantillon d'un sujet de référence souffrant d'une synucléinopathie, on pourra notamment utiliser un échantillon d'un sujet souffrant de la maladie de Parkinson (MP), de la démence à corps de Lewy (DCL) ou d'atrophie multisystématisée (AMS). Plusieurs échantillons de sujets de référence souffrant de différentes synucléinopathies peuvent être utilisés à l'étape b'). Selon ce mode de réalisation, la méthode peut en outre comprendre une étape b'') réalisée entre l'étape b') et l'étape c), de comparaison des conformères de fibres d' α -Syn de type F détectés, des conformères de fibres d' α -Syn de type F quantifiés, et/ou de l'empreinte moléculaire des conformères de fibres d' α -Syn de type F obtenus, pour les étapes b) et b'). Dans ce cas, l'étape c) comprend le diagnostic de la synucléinopathie chez le sujet en fonction de la comparaison de l'étape b''). Le sujet sera diagnostiqué comme souffrant d'une synucléinopathie si la comparaison de l'étape b') montre que le résultat de l'étape b) est comparable à celui obtenu à l'étape b') pour un échantillon de référence d'un sujet de référence souffrant d'une synucléinopathie (selon les différents échantillons de référence, un diagnostic plus précis parmi les synucléinopathies peut potentiellement être fait sur le même principe), et comme ne souffrant pas d'une synucléinopathie si le résultat de l'étape b) est comparable à celui obtenu à l'étape b') pour un échantillon de référence d'un sujet de référence sain.
- [0222] Ainsi, la méthode selon l'invention peut comprendre les étapes a'), a), b), et c) telles que décrites ci-dessus, ou les étapes a), b), b'), et c) telles que décrites ci-dessus, ou les étapes a'), a), b), b'), et c) telles que décrites ci-dessus, ou les étapes a), b), b'), b''), et c) telles que décrites ci-dessus, ou encore les étapes a'), a), b), b'), b''), et c) telles que décrites ci-dessus.
- [0223] La présente invention concerne en outre une méthode *in vitro* de stratification d'une synucléinopathie, de pronostic d'une synucléinopathie, de suivi d'une synucléinopathie, ou d'évaluation de l'efficacité d'un traitement d'une synucléinopathie chez un sujet souffrant d'une synucléinopathie, comprenant :
- [0224] a) la mise en contact d'un échantillon biologique du sujet (appelé échantillon (A))

avec au moins un aptamère selon l'invention, au moins une composition selon l'invention, au moins un kit selon l'invention, ou d'une combinaison quelconque de ceux-ci ;

- [0225] b) la détection de la présence ou l'absence d'au moins un conformère de fibres d' α -Syn de type F, la quantification des conformères de fibres d' α -Syn de type F, l'établissement d'une empreinte moléculaire de conformères de fibres d' α -Syn (de préférence de fibres d' α -Syn de type F et R d' α -Syn), ou une combinaison quelconque de ceux-ci, dans l'échantillon biologique du sujet ; et
- [0226] c) la stratification de la synucléinopathie, le pronostic de la synucléinopathie, le suivi de la synucléinopathie, l'évaluation de l'efficacité du traitement de la synucléinopathie, chez le sujet, en fonction du résultat de l'étape b);
- [0227] dans laquelle synucléinopathie est de préférence choisie parmi la maladie de Parkinson (MP), la démence à corps de Lewy (DCL) et l'atrophie Multi-Systématisée (AMS), de préférence encore synucléinopathie est la DCL.
- [0228] Selon un mode de réalisation préféré, la synucléinopathie est aggravée, ou le pronostic de la synucléinopathie est négatif, ou la synucléinopathie a évolué, ou le traitement de la synucléinopathie est inefficace ou peu efficace, si on détecte la présence d'au moins un conformère de fibres d' α -Syn de type F et/ou si on obtient une empreinte moléculaire spécifique à une synucléinopathie.
- [0229] Selon un mode de réalisation, la méthode comprend en outre une étape a') réalisée avant l'étape a), d'amplification (*in vitro*) des conformères de fibres d' α -Syn de type F et/ou de type R dans un échantillon biologique dudit sujet (appelé échantillon (A)). L'amplification des conformères de fibres peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier. De telles techniques comprennent notamment les méthodes d'amplification cyclique de protéines mal repliées (PMCA, pour « protein misfolding cyclic amplification » en anglais), par exemple telle que décrites dans Fenyi et al., 2019.
- [0230] Selon un mode de réalisation alternatif ou en combinaison avec les modes de réalisation décrits ci-dessus, la méthode *in vitro* de pronostic et/ou de stratification comprend en outre une étape b') réalisée entre l'étape b) et l'étape c), de détection de la présence ou l'absence d'au moins un conformère de fibres d' α -Syn de type F, de quantification des conformères de fibres d' α -Syn de type F, d'établissement d'une empreinte moléculaire de conformères de fibres d' α -Syn (de préférence de fibres d' α -Syn de type F et R d' α -Syn), ou une combinaison quelconque de ceux-ci, dans un ou plusieurs échantillon(s) biologique(s) de sujet(s) de référence. Le(s) sujet(s) de référence comprend(comprennent) de préférence au moins un sujet souffrant d'une synucléinopathie à un pronostic/stade/niveau de stratification connu (de préférence au moins un sujet de référence souffrant d'une synucléinopathie à un pronostic/

stade/niveau de stratification connu, la synucléinopathie étant la même pour le sujet de référence et pour le sujet testé/pronostiqué) et optionnellement au moins un sujet de référence sain. Comme échantillon d'un sujet de référence souffrant d'une synucléinopathie, on pourra notamment utiliser un échantillon d'un sujet souffrant de la maladie de Parkinson (MP), de la démence à corps de Lewy (DCL) ou d'atrophie multisystématisée (AMS). Plusieurs échantillons de sujets de référence souffrant de différentes synucléinopathies peuvent être utilisés à l'étape b'). Préférentiellement, plusieurs échantillons de sujets de référence souffrant de la même synucléinopathie mais à des pronostics/stades/niveaux de stratification différents connus peuvent être utilisés à l'étape b'). Selon ce mode de réalisation, la méthode peut en outre comprendre une étape b'') réalisée entre l'étape b') et l'étape c), de comparaison des conformères de fibres d' α -Syn de type F détectés, des conformères de fibres d' α -Syn de type F quantifiés, et/ou de l'empreinte moléculaire des conformères de fibres d' α -Syn de type F obtenus, pour les étapes b) et b'). Dans ce cas, l'étape c) comprend le pronostic et/ou la stratification de la synucléinopathie chez le sujet en fonction de la comparaison de l'étape b''). Le sujet aura un pronostic comparable, et/ou sera stratifié comme étant à un stade/niveau de stratification comparable, à celui d'un sujet de référence souffrant de la même synucléinopathie à un pronostic/stade/niveau de stratification connu, si la comparaison de l'étape b'') montre que le résultat de l'étape b) est comparable à celui obtenu à l'étape b') pour un échantillon de référence du sujet de référence (selon les différents échantillons de référence, un pronostic et/ou une stratification plus précis(e) parmi les différents stades peut potentiellement être fait sur le même principe). Le sujet aura un pronostic plus négatif, et/ou sera stratifié comme étant à un stade/niveau de stratification plus avancé (plus grave), qu'un sujet de référence souffrant de la même synucléinopathie à un pronostic/stade/niveau de stratification connu ou d'un sujet de référence sain, si le résultat de l'étape b) montre une détection plus importante de fibres F, ou une quantité de fibres d' α -Syn de type F plus élevée, ou une empreinte moléculaire plus riche en fibres F, que celui obtenu à l'étape b') pour un échantillon de référence du sujet de référence ou du sujet de référence sain. A l'inverse, le sujet aura un meilleur pronostic, et/ou sera stratifié comme étant à un stade/niveau de stratification moins avancé (moins grave), qu'un sujet de référence souffrant de la même synucléinopathie à un pronostic/stade/niveau de stratification connu, si le résultat de l'étape b) montre une détection moins importante de fibres F, ou une quantité de fibres d' α -Syn de type F moins élevée, ou une empreinte moléculaire plus pauvre en fibres F, que celui obtenu à l'étape b') pour un échantillon de référence du sujet de référence.

[0231] Ainsi, la méthode selon l'invention peut comprendre les étapes a'), a), b), et c) telles que décrites ci-dessus, ou les étapes a), b), b'), et c) telles que décrites ci-dessus, ou les

étapes a'), a), b), b'), et c) telles que décrites ci-dessus, ou les étapes a), b), b'), b''), et c) telles que décrites ci-dessus, ou encore les étapes a'), a), b), b'), b''), et c) telles que décrites ci-dessus.

[0232] Selon un mode de réalisation alternatif ou en combinaison avec les modes de réalisation décrits ci-dessus, la méthode *in vitro* de stratification d'une synucléinopathie, de pronostic d'une synucléinopathie, de suivi d'une synucléinopathie, ou d'évaluation de l'efficacité d'un traitement d'une synucléinopathie chez un sujet souffrant d'une synucléinopathie, comprend en outre une étape b') réalisée entre l'étape b) et l'étape c), de détection de la présence ou l'absence d'au moins un conformère de fibres d' α -Syn de type F, de quantification des conformères de fibres d' α -Syn de type F, d'établissement d'une empreinte moléculaire de conformères de fibres d' α -Syn (de préférence de fibres d' α -Syn de type F et R d' α -Syn), ou une combinaison quelconque de ceux-ci, dans un second échantillon biologique du sujet testé (appelé échantillon (B)). Ledit second échantillon (B) a de préférence été obtenu/prélevé postérieurement à l'échantillon (A), par exemple lors d'une seconde visite (l'échantillon (A) ayant alors lui été obtenu lors d'une première visite), de préférence ledit échantillon (B) ayant été obtenu au moins 24 heures après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 48 heures après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 72 heures après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 7 jours après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 10 jours après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 15 jours après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 1 mois après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 2 mois après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 3 mois après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 4 mois après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 5 mois après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 6 mois après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 7 mois après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 8 mois après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 9 mois après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 10 mois après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 11 mois après l'échantillon (A), de préférence encore au moins 12 mois après l'échantillon (A). De préférence encore ledit échantillon (B) a été obtenu entre 7 jours et 6 mois après l'échantillon (A), de préférence encore ledit échantillon (B) ayant été obtenu entre 10 jours et 5 mois après l'échantillon (A), de préférence encore entre 15 jours et 4 mois, de préférence encore entre 21 jours et 3 mois, de préférence encore entre 30 et 60, de préférence encore entre 40 et 50 jours. Selon ce mode de réalisation, la méthode peut en outre comprendre une étape b'') réalisée entre l'étape b') et l'étape c), de comparaison des conformères de fibres d' α -Syn de type F détectés, des conformères de fibres d' α -Syn de type F quantifiés, et/ou de l'empreinte moléculaire des conformères de fibres d' α -Syn de type F obtenus,

pour les étapes b) (donc pour l'échantillon (A) du sujet) et b') (donc pour l'échantillon (B) du sujet). Dans ce cas, l'étape c) comprend la stratification de la synucléinopathie, le pronostic de la synucléinopathie, le suivi de la synucléinopathie, l'évaluation de l'efficacité du traitement de la synucléinopathie, chez le sujet, en fonction de la comparaison de l'étape b''). Le sujet sera stratifié comme étant à un stade/niveau de stratification inchangé/comparable, ou le sujet aura un pronostic inchangé/comparable, ou la synucléinopathie n'aura pas ou peu évolué chez le sujet (sera stable), ou le traitement de la synucléinopathie sera raisonnablement efficace, si la comparaison de l'étape b') montre que le résultat de l'étape b) est comparable à celui obtenu à l'étape b').

- [0233] Le sujet sera stratifié comme étant à un stade/niveau de stratification plus avancé (plus grave), ou le sujet aura un pronostic plus négatif, ou la synucléinopathie aura évolué (aura empiré, se sera aggravée) chez le sujet, ou le traitement de la synucléinopathie sera inefficace ou peu efficace, si le résultat de l'étape b) montre une détection plus importante de fibres F, ou une quantité de fibres d' α -Syn de type F plus élevée, ou une empreinte moléculaire plus riche en fibres F, que celui obtenu à l'étape b'). A l'inverse, le sujet sera stratifié comme étant à un stade/niveau de stratification moins avancé (moins grave), ou le sujet aura un meilleur pronostic, ou la synucléinopathie se sera améliorée (sera moins grave, aura reculé) chez le sujet, ou le traitement de la synucléinopathie sera efficace, si le résultat de l'étape b) montre une détection moins importante de fibres F, ou une quantité de fibres d' α -Syn de type F moins élevée, ou une empreinte moléculaire moins riche en fibres F, que celui obtenu à l'étape b').
- [0234] La méthode selon le mode de réalisation susmentionné peut également comprendre en outre une étape a') réalisée avant l'étape a), d'amplification (*in vitro*) des conformères de fibres d' α -Syn de type F et/ou de type R dans l'échantillon (A) et ou l'échantillon (B). L'amplification des conformères de fibres peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier. De telles techniques comprennent notamment les méthodes d'amplification cyclique de protéines mal repliées (PMCA, pour « protein misfolding cyclic amplification » en anglais), par exemple telle que décrites dans Fenyi et al., 2019.
- [0235] Ainsi, la méthode selon l'invention peut comprendre les étapes a'), a), b), et c) telles que décrites ci-dessus, ou les étapes a), b), b'), et c) telles que décrites ci-dessus, ou les étapes a'), a), b), b'), et c) telles que décrites ci-dessus, ou les étapes a), b), b'), b''), et c) telles que décrites ci-dessus, ou encore les étapes a'), a), b), b'), b''), et c) telles que décrites ci-dessus.
- [0236] Les exemples qui suivent visent à illustrer la présente invention, et ne sauraient être considérés comme limitatifs.

Description des figures

- [0237] [Fig.1]: Exemple représentatif de codes barres/empreintes moléculaires des conformères de fibres d' α -Syn de type F (Panneau de gauche), R (Panneau du milieu) et 91 (panneau de droite) obtenu suite à une protéolyse ménagée à la protéinase K (PK) à différents temps en minutes (1, 5 ou 15 min, indiqué en haut de chaque panneau ; Landureau et al., 2021).
- [0238] [Fig.2]: Résultats du criblage des 28 candidats aptamères et de leurs séquences aléatoires associées contre les fibres F, R, 65 et 91 d' α -Syn : Ratio entre la quantité d'oligonucléotide restée liée sur la membrane nitrocellulose par rapport à la quantité de leur séquence aléatoire associée (Scr1-G ou Scr2-G) restée liée. Les graphiques présentent le ratio entre la quantité d'oligonucléotide restée liée sur la membrane nitrocellulose par rapport à la quantité séquence aléatoire associée (Scr1-G ou Scr2-G) restée liée.
- [0239] [Fig.3]: Mesure de l'affinité de l'aptamère N30-G pour les fibres d' α -Syn de type F ou R.
- [0240] [Fig.4]: Mesure de l'affinité de l'aptamère N30-G pour les fibres de type « amyloïdes- β » ou la fibre P110 d' α -Syn ou les monomères d' α -Syn.
- [0241] [Fig.5]: Mesure de l'affinité de l'aptamère N124-G pour les fibres d' α -Syn de type F ou R.
- [0242] [Fig.6]: Mesure de l'affinité de l'aptamère N124-G pour les fibres de type « amyloïdes- β » ou la fibre P110 d' α -Syn ou les monomères d' α -Syn.
- [0243] [Fig.7]: Détection des fibres d' α -Syn de type F par l'aptamère N30-G par séparation sur colonne Sp6.
- [0244] [Fig.8]: Exemple représentatif d'une empreinte moléculaire de la présence d'un conformère par l'analyse de la fréquence en aptamères d'un mélange par séquençage à haut-débit.
- [0245] [Fig.9]: Empreinte moléculaire de la présence d'un conformère F ou R dans un milieu par séquençage de l'évolution de la fréquence de 15 oligonucléotides. Un mélange de 14 aptamères (nommés N) et d'une séquence contrôle (nommée Scr-2 (pour Scramble 2)) a été incubé dans un milieu contenant des conformères de fibre F ou R (respectivement conditions Fn1 à Fn3 et Rn1 à Rn3) ou dans un milieu sans fibre (conditions On1 à On4). La figure représente l'évolution de la fréquence de chaque aptamère dans le mélange par rapport à sa fréquence initiale dans le mélange. Cette analyse permet de révéler une signature spécifique pour chaque conformère.

Exemples

- [0246] **EXEMPLE 1 : Conception et mises au point d'aptamères spécifiques de conformère d' α -Syn**

1.1. Matériels et méthodes

[0247] *1.1.1. SELEX*

[0248] Plusieurs SELEX ont été réalisés contre différents conformères de fibre d' α -Synucléine, notamment des conformères appelés « F » et « R ». Les conformères de fibre F ont un aspect cylindrique tandis que les conformères de fibre R ont une forme de rubans. Il a été démontré que des rongeurs peuvent développer deux formes de synucléinopathie différentes : la maladie de Parkinson et l'atrophie multi-systématisée, lorsqu'ils sont injectés avec respectivement des conformères de fibre F ou R.

[0249] Une sélection d'aptamère a été réalisée en chimie ARN dont toutes les pyrimidines sont modifiées en position 2' de leur ribose par un groupement Fluor. Cette modification chimique est connue pour augmenter considérablement la résistance des ARN à la dégradation par des RNAses.

[0250] Au cours de ces SELEX, des étapes de contre-sélection ont été réalisées pour diriger la spécificité de reconnaissance des aptamères vers un type de conformère particulier et afin de garantir que les aptamères aient peu d'affinité pour la forme monomérique d' α -Syn. Par exemple, pour sélectionner des aptamères spécifiques des conformères de fibre F, une banque de 10^{15} oligonucléotides différents a été préalablement incubée avec des formes monomériques ou des conformères de fibre R. Seuls les oligonucléotides n'ayant pas d'affinité pour ces conformations ont été utilisés pour une sélection contre conformères de fibre F. Avec ce type de contre sélection, l'objectif était d'isoler des aptamères ayant de l'affinité pour les conformères de fibre F mais dépourvus d'affinité pour les autres formes de la protéine.

[0251] Des échantillons des banques ont été analysés par séquençage à haut-débit. 28 candidats issus de ces SELEX ont été retenus (tableau 7 ci-dessous). L'affinité de ces candidats ont été criblés par filtration sur nitrocellulose.

[0252] *1.1.2. Tests d'affinité des aptamères candidats*

[0253] 10 nM de chaque aptamère candidat (hybridés par choc thermique à un oligonucléotide marqué radioactivement au P32) ont été incubés avec des conformères de fibre d' α -Syn à 1 μ M dans une solution de Ts1X (HEPES (pH 7.6) 10mM, NaCl 150mM, KCl 5mM, CaCl₂ 1,5mM, MgCl₂ 1mM) contenant de l'Igepal à 0.1% et de l'ADNss ajouté en proportion 5-1 par rapport aux oligonucléotides (c'est-à-dire à hauteur de 1.7 μ g/ml). Après 30 min d'incubation à 37°C, 25 μ L de chaque mélange est déposé en triplicat sur la membrane nitrocellulose, puis filtré. Deux lavages au Ts1X sont ensuite réalisés. Les quantités d'oligonucléotides retenus sur la membrane nitrocellulose sont quantifiés par exposition de la membrane à un écran au phosphore photostimulable.

[0254] *1.1.3. Détermination des constantes de dissociation des aptamères candidats et comparaisons avec les aptamères de l'art antérieur*

- [0255] L'affinité des aptamères a été évaluée à l'aide d'une seconde méthode, qui consiste à mesurer la quantité de complexe formée en faisant varier la concentration de l'aptamère, et en laissant celle de la cible constante. Lors de ces mesures, on se place de manière à ce que la concentration en cible soit tellement grande comparée à la concentration en aptamère, ainsi on peut négliger la quantité de cible liée à l'aptamère comparée à la quantité de cible libre. Lorsque l'interaction est de type « spécifique » entre un candidat et sa cible, la courbe de la quantité de complexe formée en fonction de la concentration en candidat initialement présente doit être hyperbolique et montrer une saturation. On peut alors calculer les constantes d'affinité de l'aptamère pour sa cible, le Bmax et le Kd.
- [0256] Les affinités des aptamères candidats ont également été comparées à des aptamères décrits dans la littérature comme ayant été sélectionnés contre α -syn. Les aptamères M5-15 et T-SO508, sélectionnés par Tsukakoshi et ses collaborateurs respectivement en 2010 et 2012 (Tsukakoshi et al., 2010, 2012), ont été choisis. Ces aptamères en chimie ADN ont été sélectionnés pour reconnaître respectivement les formes monomériques et oligomériques d' α -syn. Il a été démontré que le T-SO508, qui reconnaissait les oligomères d' α -Syn avec un kd de 68 nM, avait aussi une affinité pour les oligomères d'A β 40 (kd de 25nM). Ont également été choisis les aptamères F5R1 et F5R2, qui sont également en chimie ADN et ont été sélectionnés en 2019 par Zheng et ses collaborateurs (Zheng et al., 2018; Ren et al., 2019). Ils reconnaissent l' α -Syn avec des kd respectivement de 2.4 et 3.07 nM. Enfin, l'aptamère Tau 3146 de chimie ADN a également été testé. Cet aptamère a été isolé par un procédé rapide appelé « Non-SELEX », durant lequel trois tours de sélection successifs sans amplification entre les sélections ont été réalisés contre l'isoforme monomérique Tau 441 (Lisi et al., 2018). L'aptamère Tau 3146 a été montré comme étant capable de se lier aux isoformes Tau 441, Tau 381, Tau 352 et Tau 383 avec des kd respectivement de 13 \pm 3nM, 116 \pm 6nM, 84 \pm 6 nM et 49 \pm 4nM.
- [0257] Tous ces aptamères étant de chimie ADN, il est nécessaire de les comparer à une séquence aléatoire de la même chimie et de longueur comparable. Une séquence d'ADN utilisée au laboratoire comme amorce pour des PCR a été choisie comme contrôle. Cette amorce, nommée « Scr_ADN » a une taille de 87 nucléotides qui est comparable aux séquences des aptamères ADN que nous avons sélectionnés à partir de la littérature (Tableau 7 ci-dessous).
- [0258] **Tableau 7** – Séquences des aptamères de l'art antérieur utilisés comme comparatif pour les tests d'affinités des aptamères selon l'invention et de leur séquence aléatoire associée.

[0259] [Tableaux7]

Nom et SEQ ID NO	Séquence (sens 5'-3')	Longueur (nucléotides)
M5-15 (SEQ ID NO : 65)	ATAGTCCCATCATTATTGTATGGT ACGGCGCGGTGGCGGGTGCCTGG AGATATTAGCAAGTGTCA	66
T-SO508 (SEQ ID NO : 66)	ATACTGCCATTTCATTTTCATTTGCCT GTGGTGTGGGGCGGGTGCCTTTA GATATCAGCATGTGTCA	66
F5R1 (SEQ ID NO : 67)	ATCGAGTGTGTACGGGGTCCGGTA GGGTGGCGAGGTCTTCCTGTCGTA GCAGGATCCA	58
F5R2 (SEQ ID NO : 68)	ATCGAGTGGACGAGTGCCTCCGGT ACGAGCTGTCTGATGGGTTTGCGC GCAGGATCCA	58
Tau 3146 (SEQ ID NO : 69)	GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTCGAA CCTTTGGGGTGGCTTGACGAAGAA AGTAGTTGAGCGTTTATTCTTGCTCT CCC	76
Scr_ADN (SEQ ID NO : 64)	AATGATACGGCGACCACCGAGATC TACACTCTTTCCTACACGACGCTC TTCCGATCT	58

[0260] L'affinité des aptamères candidats ainsi que celle des aptamères issus de la littérature a également mesurée contre différentes fibres de types « amyloïdes » (fibres Tau1N3R et les fibres A β 40), outre les conformères de fibre F et R d' α -syn. L'affinité des aptamères candidats contre la fibre d' α -Syn « P110 » a également mesurée. Cette fibre a été réalisée à partir de protéine α -Syn tronquée à partir de l'acide aminé n°110 (il manque ainsi les 30 acides aminés du domaine C-terminal).

[0261] Les oligonucléotides (aptamères) à 10 nM (hybridés par choc thermique au SpG-LNA marqué radioactivement au P32 pour les oligonucléotides de chimie ARN2'F, ou bien directement marqués au P32 pour les oligonucléotides ADN) ont été présentés aux protéines à 250 nM dans une solution de Ts1X contenant de l'Igepal à 0.1% et de l'ADNss ajouté en proportion 5-1 par rapport aux oligonucléotides (c'est-à-dire entre 0.135 μ g/ml et 17.325 μ g/ml). Après 30 min d'incubation à 37°C, 25 μ L de chaque mélange est déposé sur la membrane nitrocellulose, puis filtré. Deux lavages au Ts1X

sont ensuite réalisés. Les quantités d'oligonucléotides retenues sur la membrane nitro-cellulose sont quantifiés par exposition de la membrane à un écran au phosphore photostimulable. Les Kd et Bmax ont été calculés avec l'aide du logiciel Prism en utilisant un modèle de régression non linéaire analysant l'affinité totale (spécifique et non spécifique) d'un candidat pour la cible, en faisant l'hypothèse qu'il n'existe qu'un seul site de liaison sur la cible pour le candidat.

[0262] Les mesures ont été réalisées en triplicat (trois expériences indépendantes à des jours différents) pour les fibres d' α -Syn de type F et R, et en duplicat pour les autres fibres (Tau1N3R et les fibres A β 40, et P110) ainsi que pour les monomères d' α -syn.

[0263] *1.1.4. Tests d'affinité par colonne Sp6*

[0264] Les oligonucléotides radioactivement marqués au P32 (par hybridation à un SpG-LNA marqué au P32 pour les séquences ARN2'F-Py, par marquage direct pour les séquences ADN) ont été mélangés aux protéines à 250 nM (fibre F ou monomères d' α -syn) en Ts1X, Igepal 0.1%. Après 30 min d'incubation à 37°C, 25 μ L des mélanges ont été déposés sur colonne Sp6 dont le tampon a été changé au préalable en Ts1X. Après une première centrifugation du dépôt, deux lavages au Ts1X de la colonne ont été réalisés. Les colonnes ont enfin été éluées par un lavage avec solution de SDS 2%. Les fractions ont ensuite été déposées dans une plaque 24 puits, et la plaque exposée plusieurs heures sur un écran au phosphore photostimulable. L'analyse de l'exposition a permis une quantification de chacune des fractions pour chaque condition.

[0265] *1.1.5. Empreinte moléculaire par l'analyse de la fréquence en aptamères d'un mélange par séquençage à haut-débit (FootBal-Seq)*

[0266] Un mélange de 14 aptamères (nommés N) et d'une séquence contrôle (nommée Scr-2 (pour Scramble 2)) a été incubé dans un milieu contenant des conformères de fibre F ou R (respectivement conditions Fn1 à Fn3 et Rn1 à Rn3) ou dans un milieu sans fibre (conditions On1 à On4). Le mélange a été filtré sur une colonne d'exclusion et les séquences retenues sur la colonne après 3 lavages ont été éluées par du SDS2%. Après extraction Phénol-chloroforme, le mélange d'oligonucléotides a été amplifié par RT-PCR. Au cours de cette étape les séquences ont été allongées par des séquences « adaptateurs » permettant leur séquençage à haut-débit. Après purification par électrophorèse sur gel d'agarose, les mélanges ont été séquencés par séquençage à haut-débit.

1.2. Résultats

[0267] *1.2.1. Aptamères sélectionnés par Selex*

[0268] Le Tableau 8 ci-dessous présente les séquences des candidats retenus.

[0269] Tableau 8 -Séquences des candidats aptamères sélectionnés. Les parties aléatoires (i.e. les parties spécifiques) des séquences sont soulignées, et les parties constantes correspondant aux sites des amorces ne sont pas soulignées. Les aptamères Scr-1 et Scr-2

ont une séquence aléatoire.

[0270] [Tableaux8]

N0	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAUCAGUCCAGUACGAGACGCGUU</u> <u>UACCUCCACUGCAAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG</u>
N1	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAAUCCGACCAACCCAACGCGUUU</u> <u>ACCUCACCUGCAAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG</u>
N2	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAUUCCGACCGCCGCAACUUAUAG</u> <u>GUAUCCCGCUGCAAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG</u>
N3	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGACAACGCGUUUACCUACACCAC</u> <u>GUCAUCCGUUGCCAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG</u>
N4	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAACGCGUUUACUCCGCUAGUACG</u> <u>AACCCGAUUGCCCAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG</u>
N5	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAAGCCAUGCUGUCAACUUUUAAC</u> <u>UCGUCACCGCUCGAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG</u>
N15	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAAUCCGGCCACAGUCGACAACUUU</u> <u>GAAAUCCACCUGCAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG</u>
N20	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAGCAGCACAUAGACCUCACCUUUU</u> <u>ACUCUGCGCUGCAAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG</u>
N30	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAUCGAUCCACGUCCGACAACGCG</u> <u>UUUACUCGCCAUCAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG</u>
N37	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAUCAGUCCAGCACCAACGCCGUU</u> <u>UGCUCUCGACUACAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG</u>
N62	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAGUUUCCGAACGGCCCAACUUUG</u> <u>AAAUCCCCGCCCGAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG</u>
N73	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGACAACUUGAAAUCCCAACCCUGC</u> <u>AGCCGUGUCUGGUAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG</u>
N124	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAUCCGACCAUGCUCUACAACUUAUA</u> <u>CCUCGGGGACUGUAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG</u>
N164	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAGUUUCCGACCACGACCCAACGU</u> <u>UACUGCCCACCACAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG</u>
Scr-2	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGAGGCUGAUUCAACACCGUUUGACGUUCUU</u> <u>GGUAUCGGAAGACAGAUCGGAAGAGCGUCGUGUAGG</u>
4F01	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUAGCAGCACACGACCAGUGUGCC</u> <u>CCACACCAGUGGUGGUCUGUGGUGUGCAGAUCGGAAGAGCGUCG</u> <u>UGUAGG</u>

4F02	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUGCUGGCAGCACGCACCGCUGAC</u> <u>CGCUGGCUGCACUAUGCGUGUGGAGUGCAGAUCGGAAGAGCGUCG</u> UGUAGG
4F03	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUGC AACAGACGCACCGUACACAC</u> <u>AUCUUGGCCGUUGGCUGCCCGACCAGCCAGAUCGGAAGAGCGUCG</u> UGUAGG
4F04	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUCCGUCCACCAGACCAACGUACA</u> <u>AACUCCGCUGGUGGUCGCCUACCCUGGCAGAUCGGAAGAGCGUCG</u> UGUAGG
4F05	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUGCCCGCAGGCUACACCACAGCUU</u> <u>CCCCUUCAGCGUGUUGUGGAUACUCGGCAGAUCGGAAGAGCGUCG</u> UGUAGG
R01	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUUGCCGCACUACAGCUUGGUCUG</u> <u>CAUAUCCUCUGCGCACAGCUCCAUGUGCAGAUCGGAAGAGCGUCG</u> UGUAGG
R02	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUGCACGAUGUCCAUGACCAACUC</u> <u>CAGUCACGGCCCUGCAGCGUUAGGCUGUAGAUCGGAAGAGCGUCG</u> UGUAGG
R03	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUCCAGCAUCACCAGCGGCACGAC</u> <u>GUCGGACGGCUGGCUGGUCACCGUAGAUCGGAAGAGCGUCG</u> UGUAGG
R04	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUGCAGAGCUACACGGUGCAAGU</u> <u>AGCACGUCCUGCCAUGCAUGCAGUGCUGCAGAUCGGAAGAGCGUC</u> GUGUAGG
R05	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUCGGGAAGCAGCACGACGGCCUC</u> <u>AAUGCACUUGCCGGUUGGUUUCGGCUGCAGAUCGGAAGAGCGUCG</u> UGUAGG
Scr-1	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUAUCGUUCAGCGUGGGAUCUCG</u> <u>UACAACUCCUGAGUGC UACAUGUACGAGAAGAUCGGAAGAGCGUC</u> GUGUAGG
PF_1 24	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUCACGGACACCUACCCGACGGCA</u> <u>UGUCAGGACACAUGUUGUGCUCGUGUGAGAUCGGAAGAGCGUCG</u> UGUAGG
R_84	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUCUGCGAAGUGCCCAAGACCAUA</u> <u>UCCACUGCACACGACAGCUGAUGGUGGCAGAUCGGAAGAGCGUCG</u>

	UGUAGG
P65_10854	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUCGCACAGUGUACACCUACACACAGCAUACCUGUUGGCAUCCCAGGUUGCCAGAUCGGAAGAGCGUCG</u> UGUAGG
P91_70	<u>GGGAGAGUAUCCGUUGGAGGCAUGCACACACACAUCGCACGUCA</u> <u>CCCACUAUGGGGACAUCUUGCGGCGUGCAGAUCGGAAGAGCGUCG</u> UGUAGG

[0271] *1.2.2. Affinité des aptamères candidats pour les différents conformères d'α-syn*

[0272] La [Fig.2] montre que les aptamères N3, N30, N124, 4F01, 4F02, 4F03, 4F05, F124 et P65 restent liés aux conformères de fibres d'α-Syn de type F en quantité bien plus importante que des séquences aléatoires. En particulier, les candidats N3-G, N30-G et N124-G restent en moyenne 3.5 fois plus liés aux fibres d'α-Syn de type F que le Scr2-G.

[0273] Les données montrent en outre que les aptamères N3, N30, N124, 4F01, 4F02, 4F03, 4F05, F124 et P65 restent liés aux conformères de fibres d'α-Syn de type F en quantité bien plus importante qu'aux autres conformères (R, 91 et 61 ; [Fig.2]). Ces résultats démontrent que les aptamères N3, N30, N124, 4F01, 4F02, 4F03, 4F05, F124 et P65 sont capables de discriminer les conformères de fibres d'α-Syn de type F des autres conformères d'α-syn.

[0274] *1.2.3. Détermination des constantes de dissociation des aptamères candidats et comparaison avec les aptamères de l'art antérieur*

[0275] Les résultats représentatifs de chaque test d'affinité sont représentés par les Figures 3 et 4 pour les aptamères N30 et par les Figures 5 et 6 pour les aptamères N124. Les calculs des K_d et B_{max} calculés par Prism sont indiqués sur les graphiques, lorsque qu'il a été déterminé que l'aptamère se liait significativement à la protéine par rapport à sa séquence aléatoire associée.

[0276] Les tableaux 9 à 12 ci-dessous récapitulent les moyennes des K_d et B_{max} calculés pour chaque aptamère et pour chaque protéine, à partir de l'ensemble des duplicats ou triplicats d'expériences réalisées, pour chaque type de fibre.

[0277] **Tableau 9** - Moyenne des constantes d'affinités (K_d et B_{max}) calculées pour les candidats oligonucléotides, pour les fibres d'α-Synucléine de type F.

[0278] [Tableaux9]

Fibre d'α-Synucléine de type F			
	K_d	B_{max}	Reproductibilité
N30-G	6,62 nM +/- 4,8%	52,48 fmol +/- 32,2%	3/3
N124-G	8,83 nM +/- 14,9%	38,69 fmol +/- 33,6%	3/3
T-SO508	7,80 nM +/- 4,6%	20,74 fmol +/- 47,2%	2/2
M5-15	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	
F5R1	3,50 nM +/- 15,8%	13,66 fmol +/- 28,1%	2/2
F5R2	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	

[0279] **Tableau 10** - Moyenne des constantes d'affinités (K_d et B_{max}) calculées pour les candidats oligonucléotides, pour les fibres d'α-Synucléine de type R.

[0280] [Tableaux10]

Fibre d'α-Synucléine de type R			
	K_d	B_{max}	Reproductibilité
N30-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	3/3
N124-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	3/3
T-SO508	18,88 nM +/- 3,8%	49,95 fmol +/- 102,3%	2/2
M5-15	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	
F5R1	32,41 nM +/- 92,9%	90,54 fmol +/- 119,0%	2/2
F5R2	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	

[0281] **Tableau 11** - Moyenne des constantes d'affinités (K_d et B_{max}) calculées pour les candidats oligonucléotides, pour les fibres d'α-Synucléine de type P110.

[0282] [Tableaux11]

Fibre d'α-Synucléine de type P110			
	K_d	B_{max}	Reproductibilité
N30-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	
N124-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	
T-SO508	23,57 nM +/- 59,4%	48,18 fmol +/- 16,8%	2/2
M5-15	-	-	
F5R1	8,92 nM	25,04 fmol	1/2
F5R2	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	

[0283] **Tableau 12** - Moyenne des constantes d'affinités (K_d et B_{max}) calculées pour les candidats oligonucléotides, pour les fibres d'Amyloïde β .

[0284] [Tableaux12]

	Amyloïde- β		
	K_d	B_{max}	Reproductibilité
N30-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	
N124-G	27,13 nM	18,55 nM	
T-SO508	43,21 nM +/- 4,4%	22,24 fmol +/- 58,1%	2/2
M5-15	-	-	
F5R1	2,54E+25 +/- 141,4%	3,46E+24 +/- 141,4%	2/2
F5R2	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	

[0285] En pourcentage est exprimé le coefficient de variation, le ratio entre l'écart type des valeurs et leur moyenne. La colonne « reproductibilité » donne le nombre d'expériences pour lesquelles liaison entre l'aptamère et la cible a été mesurée. Le symbole « - » signifie qu'aucune expérience n'a été réalisée. La mention « Pas de liaison » est indiqué dans le tableau lorsque la liaison de l'aptamère testé n'est pas significativement supérieure à celle de la séquence aléatoire qui lui est associée.

[0286] Les données montrent que les mesures des affinités pour la fibre F sont très reproductibles : les aptamères N30-G, N124-G, T-SO508 et F5R1 se lient aux fibres d' α -Syn de type F avec des K_d inférieurs à 10 nM à chaque expérience. Les aptamères T-SO508 et F5R1 se lient également aux fibres d' α -Syn de type R à chaque expérience, tandis que les aptamères N30-G et N124-G ne se lient pas aux fibres d' α -Syn de type R de manière significativement supérieure par rapport à leur séquences aléatoires associées. Les aptamères M5-15, F5R2 et Tau 3146 ne se lient ni aux fibres F, ni aux fibres d' α -Syn de type R (pas de fixation significativement supérieure à leur séquences aléatoires associées).

[0287] Ainsi, les données révèlent que seuls les aptamères N30-G et N124-G sont capables de discriminer la fibre F de la fibre R parmi les aptamères testés.

[0288] Les aptamères de l'art antérieur reconnaissent soit les 2 fibres avec des affinités comparables (aptamères T-SO508 et F5R1), soit ne sont pas capables de reconnaître les fibres d' α -Syn de type R ni les fibres d' α -Syn de type F (M5-15, F5R2 et Tau 3146).

[0289] Les aptamères T-SO508 et F5R1 ont des K_d plus faibles pour la fibre F et des B_{max} plus importants pour la fibre R (différant de l'ordre d'un facteur 2). Toutefois, une différence de K_d d'un facteur 2 n'est pas suffisant pour permettre une discrimination fiable entre les 2 types de fibres.

- [0290] Les figures 4 et 6 montrent en outre que les aptamères N30 et N124 ne présentent aucune affinité pour les monomères d' α -Syn.
- [0291] De même, les données révèlent que les aptamères N30 et N124 ne reconnaissent pas les fibres d'amyloïde- β de manière significative (figures 4 et 6 et tableau 9).
- [0292] L'ensemble de ces données démontrent que les aptamères N30 et N124 possèdent une affinité hautement spécifique pour la fibre F d' α -Syn. En effet, les aptamères N30 et N124 sont capables de discriminer, de manière reproductible et spécifique, la fibre F d' α -Syn non seulement de la fibre R d' α -Syn mais également du monomère d' α -Syn et d'autres types de fibres telles les fibres d'amyloïde- β .
- [0293] *1.2.4. Tests d'affinité par colonne Sp6*
- [0294] L'affinité de l'aptamère N30-G pour les conformères de fibre F ou les monomères a été testée par filtration sur colonne d'exclusion (Sp6 de Biorad). Les capacités de l'aptamère N30-G ont été comparées à celles de l'aptamère T-SO508. Les séquences Scr2-G et Scr_ADN ont été utilisées comme contrôles.
- [0295] Les résultats des essais de détection sont présentés [Fig.7]. Les données montrent que ces résultats sont reproductibles. On observe que lorsque les oligonucléotides ont été présenté aux fibres d' α -Syn de type F, 16.7% du N30-G, 2.1% du Scr2-G, 3.9% du T-SO508 et 3.0% du Scr_ADN sont élués dans la fraction du lavage au SDS 2% des colonnes Sp6. Ceci signifie que le N30-G est environ 8 fois mieux retenu aux fibres d' α -Syn de type F que sa séquence aléatoire associée, et 4 fois mieux retenu que le T-SO508. Ces résultats sont une nouvelle confirmation de la capacité du N30-G à reconnaître les fibres F, et aussi de sa supériorité face au T-SO508.
- [0296] Les données montrent que, lorsque le N30-G a été présenté aux monomères, seul 1.1% des oligonucléotides sont élués dans la fraction d'élué du SDS 2%. Ceci signifie que le N30-G reconnaît les fibres d' α -Syn de type F environ 16 fois mieux que les monomères. De manière intéressante, les fractions éluées par SDS 2% sont similaires pour le T-SO508 qu'il ait été présenté aux fibres d' α -Syn de type F ou aux monomères (respectivement 3.9 et 3.8%). Ces résultats montrent que le T-SO508 ne réalise pas de distinction entre les fibres d' α -Syn de type F et les monomères.
- [0297] *1.2.5. Obtention d'une empreinte moléculaire diagnostique par FootBal-Seq*
- [0298] Les Inventeurs ont développé une nouvelle méthode de diagnostic utilisant un mélange d'aptamères pour diagnostiquer la présence d'un conformère de fibre dans un milieu ([Fig.8]). Une sélection de 14 des 28 aptamères mis au point a été mélangée en quantité équimolaire, ainsi qu'une séquence contrôle. Ce mélange a été incubé dans un milieu ne contenant aucune fibre ou contenant des conformères de Fibre soit F ou R. Les mélanges ont ensuite été déposés sur colonne d'exclusion Sp6. Après amplification et purification, les mélanges ont été séquencés par séquençage à haut-débit. La proportion de chaque séquence dans le mélange est comparée à la proportion de départ.

- [0299] La [Fig.9] représente l'évolution de la fréquence de chaque aptamère dans le mélange par rapport à sa fréquence initiale dans le mélange. Cette analyse permet de révéler une signature spécifique pour chaque conformère. Par exemple un fort enrichissement en N30, N73 et N15 par rapport aux autres séquences pour le conformère de Fibre F et un enrichissement en séquences N30, N124, N5, N73 et N15 pour le conformère de fibre R.
- [0300] Ainsi, les données mettent en évidence une signature spécifique pour les conformères de fibre F et les conformères de fibre R ([Fig.9]).
- [0301] Ces résultats ont été confirmés sur des échantillons de patients. Ces données confirment qu'un tel mélange d'aptamères peut être utilisé pour obtenir une signature à partir d'échantillons biologiques de patients, permettant ainsi le diagnostic de maladies neurodégénératives. Ce mélange permet notamment de déterminer si le patient souffre d'une synucléinopathie ou d'un autre type de maladie neurodégénérative. Dans le cas où il s'agit d'une synucléinopathie, il est également possible de déterminer laquelle, par le même test.

REFERENCES

- [0302] Agrawal, M., and Biswas, A. (2015). Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders. *Front Mol Biosci* 2, 54.
- [0303] Beach, T.G. (2017). A Review of Biomarkers for Neurodegenerative Disease: Will They Swing Us Across the Valley? *Neurol. Ther.* 6, 5–13.
- [0304] Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P.H., Habenstein, B., Madiona, K., Olieric, V., Bockmann, A., Meier, B.H., et al. (2013). Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun* 4, 2575.
- [0305] Cheng, H.-C., Ulane, C.M., and Burke, R.E. (2010). Clinical Progression in Parkinson's Disease and the Neurobiology of Axons. *Ann. Neurol.* 67, 715–725.
- [0306] Fenyi, A., Duyckaerts, C., Bousset, L., Braak, H., Tredici, K.D., Melki, R., and on behalf of the Brainbank Neuro-CEB Neuropathology Network (2021). Seeding Propensity and Characteristics of Pathogenic α Syn Assemblies in Formalin-Fixed Human Tissue from the Enteric Nervous System, Olfactory Bulb, and Brainstem in Cases Staged for Parkinson's Disease. *Cells* 10, 139.
- [0307] Fenyi, A., Leclair-Visonneau, L., Clairembault, T., Coron, E., Neunlist, M., Melki, R., (2019). Detection of alpha-synuclein aggregates in gastrointestinal biopsies by protein misfolding cyclic amplification, *Neurobiology of Disease* 129, 38-43.
- [0308] Gómez-Río, M., Caballero, M.M., Górriz Sáez, J.M., and Mínguez-Castellanos, A. (2016). Diagnosis of Neurodegenerative Diseases: The Clinical Approach. *Curr. Alzheimer Res.* 13, 469–474.
- [0309] Landureau, M., Redeker, V., Bellande, T., Eyquem, S., and Melki, R. (2021). The

- differential solvent exposure of N-terminal residues provides ‘fingerprints’ of alpha-synuclein fibrillar polymorphs. *J. Biol. Chem.* *0*, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100737>.
- [0310] Katsuno, M., Sahashi, K., Iguchi, Y., and Hashizume, A. (2018). Preclinical progression of neurodegenerative diseases. *Nagoya J Med Sci* *80*, 289–298.
- [0311] Makky, A., Bousset, L., Polesel-Maris, J., and Melki, R. (2016). Nanomechanical properties of distinct fibrillar polymorphs of the protein alpha-synuclein. *Sci Rep* *6*.
- [0312] Peelaerts, W., Bousset, L., Van der Perren, A., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., Giugliano, M., Van den Haute, C., Melki, R., and Baekelandt, V. (2015). α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* *522*, 340–344.
- [0313] Perrin, R.J., Payton, J.E., Barnett, D.H., Wraight, C.L., Woods, W.S., Ye, L., and George, J.M. (2003). Epitope mapping and specificity of the anti- α -synuclein monoclonal antibody Syn-1 in mouse brain and cultured cell lines. *Neurosci. Lett.* *349*, 133–135.
- [0314] Pieri, L., Madiona, K., and Melki, R. (2016). Structural and functional properties of prefibrillar α -synuclein oligomers. *Sci. Rep.* *6*.
- [0315] Ren, X., Zhao, Y., Xue, F., Zheng, Y., Huang, H., Wang, W., Chang, Y., Yang, H., and Zhang, J. (2019). Exosomal DNA Aptamer Targeting alpha-Synuclein Aggregates Reduced Neuropathological Deficits in a Mouse Parkinson’s Disease Model. *Mol Ther Nucleic Acids* *17*, 726–740.
- [0316] Rey, N.L., Bousset, L., George, S., Madaj, Z., Meyerdirk, L., Schulz, E., Steiner, J.A., Melki, R., and Brundin, P. (2019). alpha-Synuclein conformational strains spread, seed and target neuronal cells differentially after injection into the olfactory bulb. *Acta Neuropathol Commun* *7*, 221.
- [0317] Tsukakoshi, K., Harada, R., Sode, K., and Ikebukuro, K. (2010). Screening of DNA aptamer which binds to alpha-synuclein. *Biotechnol Lett* *32*, 643–648.
- [0318] Vaikath, N.N., Majbour, N.K., Paleologou, K.E., Ardah, M.T., van Dam, E., van de Berg, W.D.J., Forrest, S.L., Parkkinen, L., Gai, W.-P., Hattori, N., et al. (2015). Generation and characterization of novel conformation-specific monoclonal antibodies for α -synuclein pathology. *Neurobiol. Dis.* *79*, 81–99.
- [0319] Vaikath, N.N., Hmila, I., Gupta, V., Erskine, D., Ingelsson, M., and El-Agnaf, O.M.A. (2019). Antibodies against alpha-synuclein: tools and therapies. *J Neurochem* *150*, 612–625.
- [0320] Van der Perren, A., Gelders, G., Fenyi, A., Bousset, L., Brito, F., Peelaerts, W., Van den Haute, C., Gentleman, S., Melki, R., and Baekelandt, V. (2020). The structural differences between patient-derived α -synuclein strains dictate characteristics of Parkinson’s disease, multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies. *Acta*

Neuropathol. (Berl.) *139*, 977–1000.

- [0321] Zheng, Y., Qu, J., Xue, F., Zheng, Y., Yang, B., Chang, Y., Yang, H., and Zhang, J. (2018). Novel DNA Aptamers for Parkinson's Disease Treatment Inhibit alpha-Synuclein Aggregation and Facilitate its Degradation. *Mol Ther Nucleic Acids* *11*, 228–242.

Revendications

- [Revendication 1] Aptamère caractérisé en ce qu'il possède la capacité de distinguer les conformères de fibres d' α -Syn de type F de la protéine α -Syn (α -Syn) des conformères de fibres d' α -Syn de type R, et en ce qu'il comprend une séquence spécifique d'acide ribonucléique (ARN) modifié ayant au moins 85% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :6, et SEQ ID NO :7, de préférence choisie parmi SEQ ID NO :1 et SEQ ID NO :2.
- [Revendication 2] Aptamère selon la revendication 1, dont la constante de dissociation $K_{d(F)}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F est :
- inférieure à la constante de dissociation $K_{d(R)}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type R, de préférence inférieure d'au moins 10 fois ;
 - inférieure à la constante de dissociation $K_{d(Mono)}$ mesurée pour les monomères d' α -Syn, de préférence inférieure d'au moins 2 fois ;
 - inférieure à la constante de dissociation $K_{d(Aléatoire)}$ d'un aptamère aléatoire mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F, de préférence inférieure d'au moins 2 fois ;
 - inférieure à la constante de dissociation $K_{d(R)}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type R, de préférence inférieure d'au moins 10 fois ; et inférieure à la constante de dissociation $K_{d(Mono)}$ mesurée pour les monomères d' α -Syn, de préférence inférieure d'au moins 2 fois ;
 - inférieure à la constante de dissociation $K_{d(R)}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type R, de préférence inférieure d'au moins 10 fois ; et inférieure à la constante de dissociation $K_{d(Aléatoire)}$ d'un aptamère aléatoire mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F, de préférence inférieure d'au moins 2 fois ; ou
 - inférieure à la constante de dissociation $K_{d(R)}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type R, de préférence inférieure d'au moins 10 fois ; inférieure à la constante de dissociation $K_{d(Mono)}$ mesurée pour les monomères d' α -Syn, de préférence inférieure d'au moins 2 fois ; et inférieure à la constante de dissociation $K_{d(Aléatoire)}$ d'un aptamère aléatoire mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F, de préférence inférieure d'au moins 2 fois.
- [Revendication 3] Aptamère selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, ayant au

moins une constante de dissociation K_d comme suit :

- a. la constante de dissociation $K_{d(F)}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type F est inférieure à 15 nM, de préférence inférieure à 10 nM ; et/ou
- b. la constante de dissociation $K_{d(R)}$ mesurée pour les conformères de fibres d' α -Syn de type R est supérieure à 100 nM, de préférence supérieure à 150 nM.

[Revendication 4] Aptamère selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, comprenant en outre :

- i. en 5' de la séquence spécifique, une séquence amorce d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :29 et SEQ ID NO :30, de préférence située à l'extrémité 5' de la séquence spécifique ; et/ou
- ii. en 3' de la séquence spécifique, une séquence amorce d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :31, SEQ ID NO :32 et SEQ ID NO :33, de préférence située à l'extrémité 3' de la séquence spécifique.

[Revendication 5] Aptamère selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, comprenant une séquence d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :34, SEQ ID NO :35, SEQ ID NO :36, SEQ ID NO :37, SEQ ID NO :38, SEQ ID NO :39, et SEQ ID NO :40, de préférence choisie parmi SEQ ID NO :34 et SEQ ID NO :35.

[Revendication 6] Kit comprenant au moins un aptamère selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

[Revendication 7] Kit selon la revendication 6, comprenant en outre au moins un aptamère additionnel choisi parmi les aptamères comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :9, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :11, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :13, SEQ ID NO :14, SEQ ID NO :15, SEQ ID NO :16 et SEQ ID NO :17, SEQ ID NO :18,

SEQ ID NO :19, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :21, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :23, SEQ ID NO :24, SEQ ID NO :25, SEQ ID NO :26, SEQ ID NO :27, et SEQ ID NO :28 ;

le kit comprenant de préférence en outre un aptamère comprenant une séquence aléatoire d'ARN modifié.

[Revendication 8]

Kit selon la revendication 7, dans lequel au moins un aptamère additionnel comprend en outre :

- i. en 5' de la séquence spécifique, une séquence amorce d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :29 et SEQ ID NO :30, de préférence située à l'extrémité 5' de la séquence spécifique ; et/ou
- ii. en 3' de la séquence spécifique, une séquence amorce d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité, de préférence au moins 90% d'identité, de préférence au moins 95% d'identité, avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :31, SEQ ID NO :32, et SEQ ID NO :33, de préférence située à l'extrémité 3' de la séquence spécifique.

[Revendication 9]

Kit selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, dans lequel au moins un aptamère additionnel est choisi parmi les aptamères comprenant une séquence d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec une séquence choisie parmi SEQ ID NO :40, SEQ ID NO :41, SEQ ID NO :42, SEQ ID NO :43 , SEQ ID NO :44, SEQ ID NO :45, SEQ ID NO :46, SEQ ID NO :47, SEQ ID NO :48 et SEQ ID NO :49, SEQ ID NO :50, SEQ ID NO :51, SEQ ID NO :52 , SEQ ID NO :53, SEQ ID NO :54, SEQ ID NO :55, SEQ ID NO :56, SEQ ID NO :57, SEQ ID NO :58, SEQ ID NO :59, et SEQ ID NO :60.

[Revendication 10]

Kit selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, comprenant au moins les aptamères suivants :

- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :1,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :2,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :3 ,

- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :8,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :9,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :10 ,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :11,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :12 ,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :13 ,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :14,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :16,
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :17, et
- aptamère comprenant une séquence spécifique d'ARN modifié ayant au moins 85% d'identité avec SEQ ID NO :18;

le kit comprenant de préférence en outre un aptamère comprenant une séquence aléatoire d'ARN modifié.

[Revendication 11] Kit selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, caractérisé en ce que, lorsque le kit comprend plusieurs aptamères, ceux-ci sont :

- a. tous dans une seule composition, ou
- b. répartis dans plusieurs compositions distinctes dans des récipients séparés, incluant le cas où chacun des aptamères est dans une composition distincte située dans un récipient séparé.

[Revendication 12] Aptamère selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou kit selon l'une quelconque des revendications 6 à 11, dans lequel l'ARN de l'aptamère ou de tous les aptamères du kit a été modifié afin d'augmenter sa résistance vis-à-vis des nucléases ARN, de préférence dans lequel les riboses des pyrimidines de l'aptamère ou de tous les aptamères du kit portent un atome de fluor sur le carbone en position 2'.

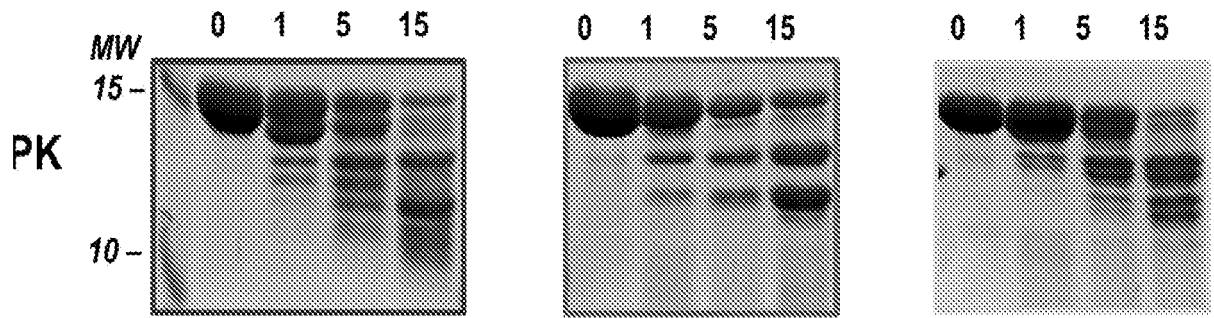
- [Revendication 13] Utilisation *in vitro* d'au moins un aptamère selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 et 12, d'au moins un kit selon l'une quelconque des revendications 6 à 12, ou d'une combinaison quelconque de ceux-ci, pour :
- a. détecter la présence ou l'absence d'au moins un conformère de fibres d' α -Syn de type F dans un échantillon biologique ;
 - b. déterminer la quantité d'un conformère de fibres d' α -Syn de type F dans un échantillon biologique ;
 - c. établir une empreinte moléculaire de conformères de fibres d' α -Syn, de préférence de fibres d' α -Syn de type F et R d' α -Syn, dans un échantillon biologique ;
 - d. cribler des composés/molécules capables de détecter et/ou reconnaître d'un conformère de fibres d' α -Syn de type F, de préférence cribler des composés/molécules capables de discriminer les conformères de fibres d' α -Syn de type F des conformères de fibres d' α -Syn de type R ; ou
 - e. une combinaison quelconque de a) à d).

- [Revendication 14] Méthode *in vitro* de diagnostic d'une synucléinopathie chez un sujet ayant au moins un symptôme de maladie neurodégénérative, comprenant :
- a) la mise en contact d'un échantillon biologique du sujet avec au moins un aptamère selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 et 13, avec au moins un kit selon l'une quelconque des revendications 7 à 13, ou avec une combinaison quelconque de ceux-ci;
 - b) la détection de la présence ou l'absence d'au moins un conformère de fibres d' α -Syn de type F, la quantification des conformères de fibres d' α -Syn de type F, l'établissement d'une empreinte moléculaire de conformères de fibres d' α -Syn (de préférence de fibres d' α -Syn de type F et R d' α -Syn), ou une combinaison quelconque de ceux-ci, dans l'échantillon biologique du sujet ; et
 - c) le diagnostic de la présence ou l'absence d'une synucléinopathie chez le sujet en fonction du résultat de l'étape b).

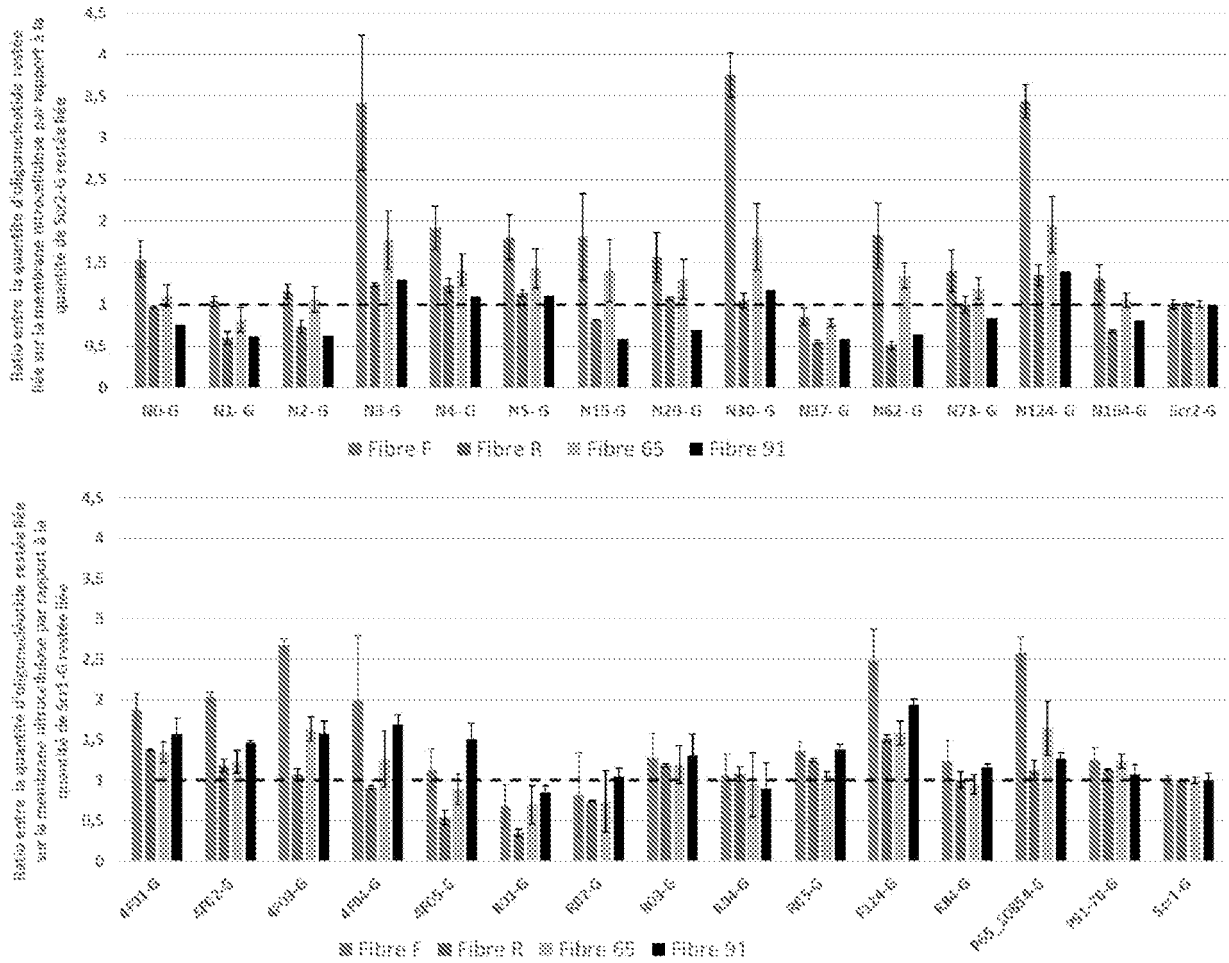
- [Revendication 15] Méthode *in vitro* de stratification d'une synucléinopathie, de pronostic d'une synucléinopathie, de suivi d'une synucléinopathie, ou d'évaluation de l'efficacité d'un traitement d'une synucléinopathie chez un sujet souffrant d'une synucléinopathie, comprenant :

- a) la mise en contact d'un échantillon biologique du sujet avec au moins un aptamère selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 et 13, avec au moins un kit selon l'une quelconque des revendications 7 à 13, ou avec une combinaison quelconque de ceux-ci ;
- b) la détection de la présence ou l'absence d'au moins un conformère de fibres d' α -Syn de type F, la quantification des conformères de fibres d' α -Syn de type F, l'établissement d'une empreinte moléculaire de conformères de fibres d' α -Syn (de préférence de fibres d' α -Syn de type F et R d' α -Syn), ou une combinaison quelconque de ceux-ci, dans l'échantillon biologique du sujet ; et
- c) la stratification de la synucléinopathie, le pronostic de la synucléinopathie, le suivi de la synucléinopathie, l'évaluation de l'efficacité du traitement de la synucléinopathie, chez le sujet, en fonction du résultat de l'étape b);
- dans laquelle synucléinopathie est de préférence choisie parmi la maladie de Parkinson (MP), la démence à corps de Lewy (DCL) et l'atrophie Multi-Systematisée (AMS), de préférence encore synucléinopathie est la DCL.

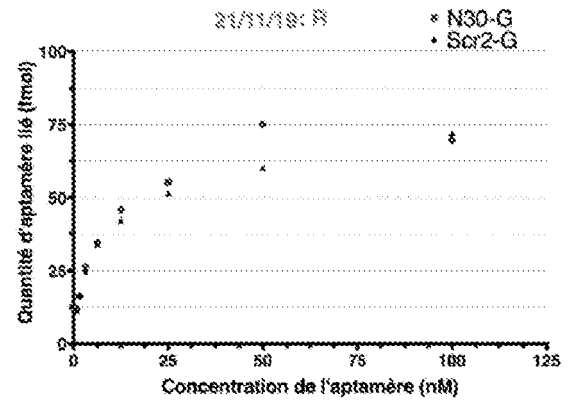
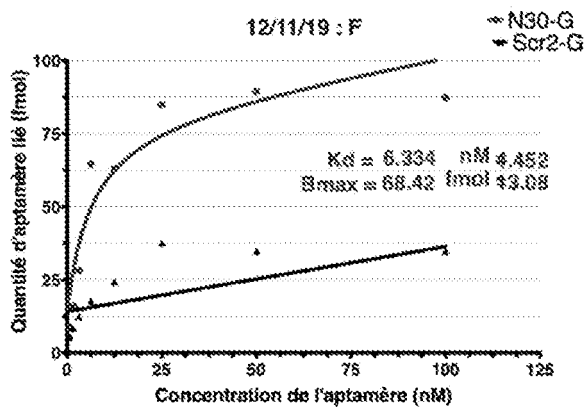
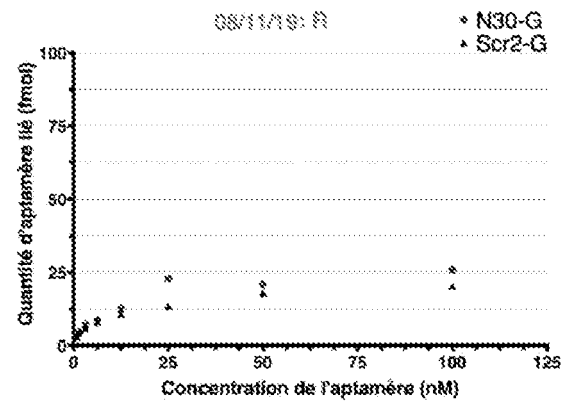
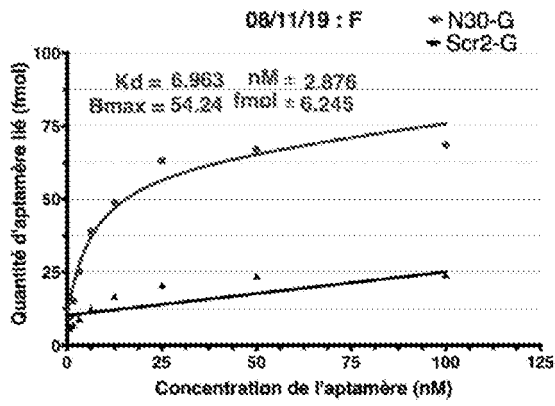
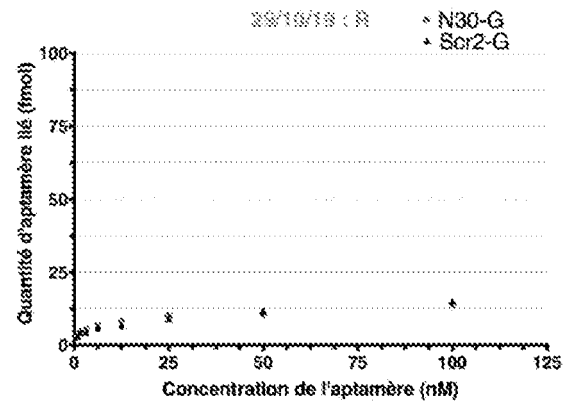
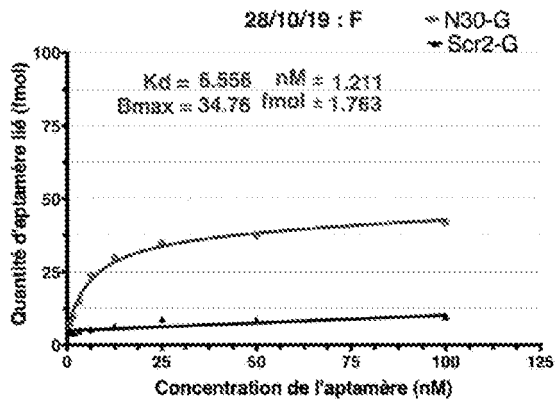
[Fig. 1]



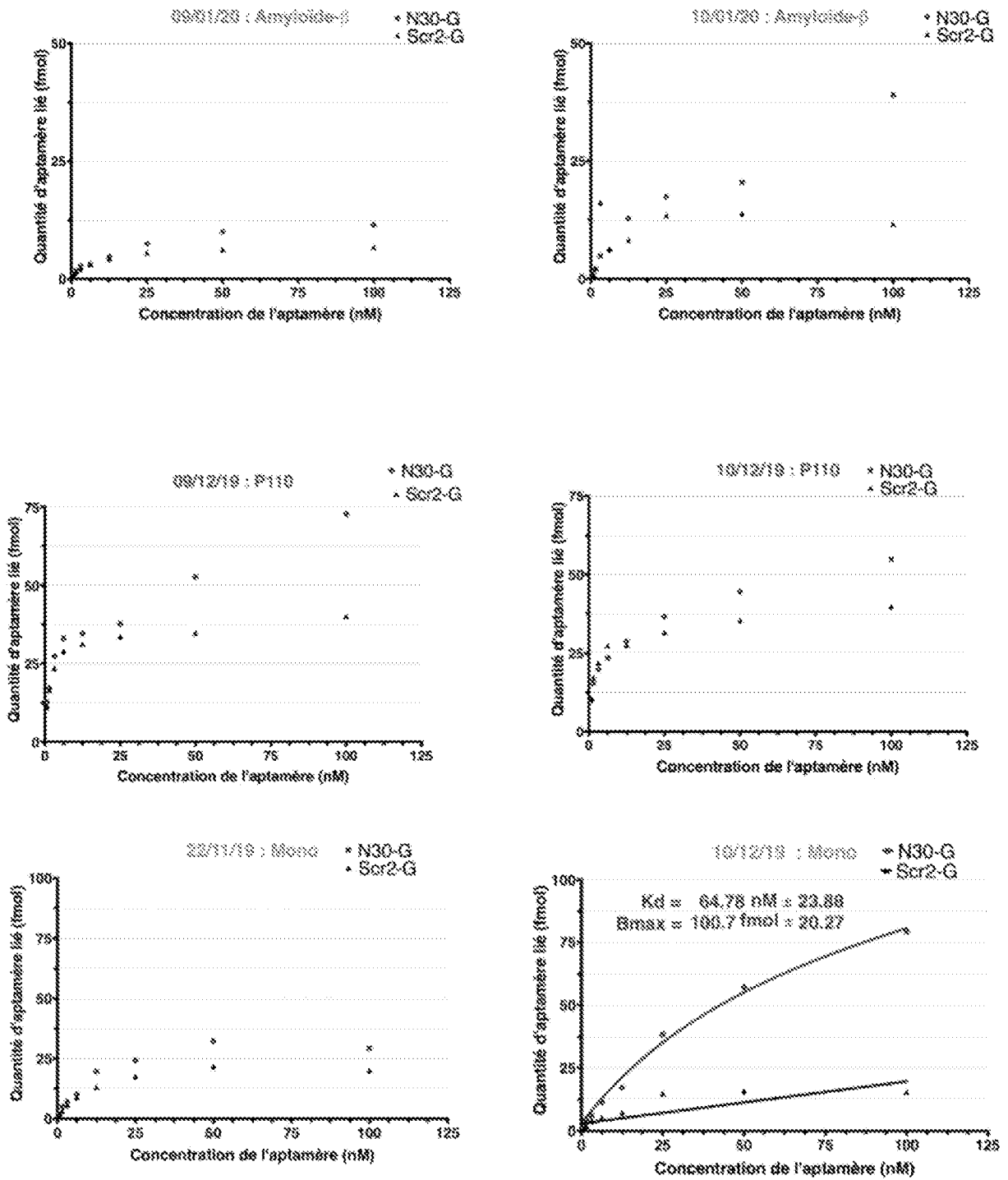
[Fig. 2]



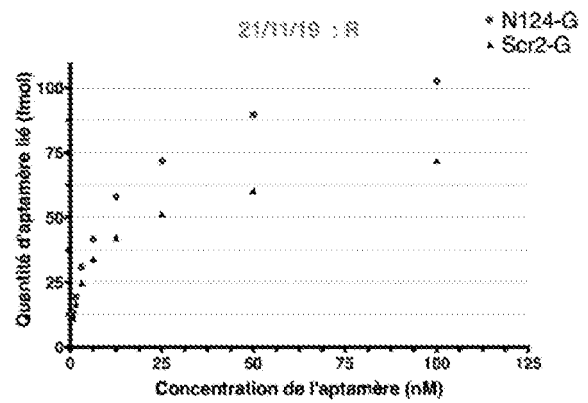
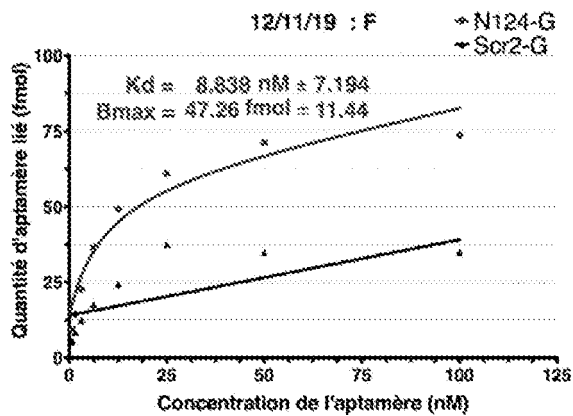
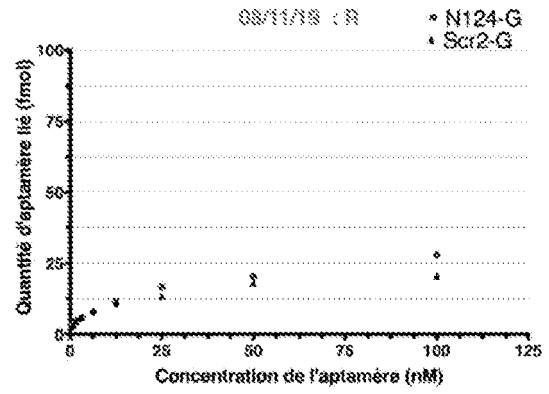
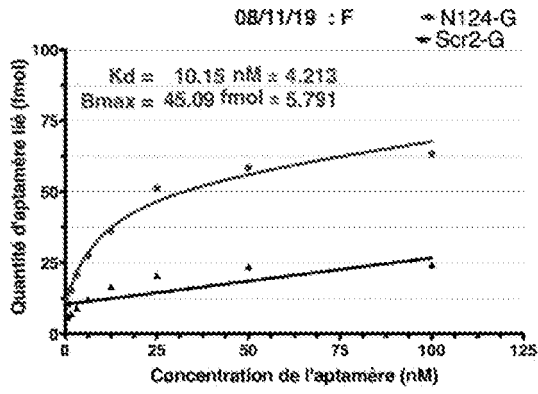
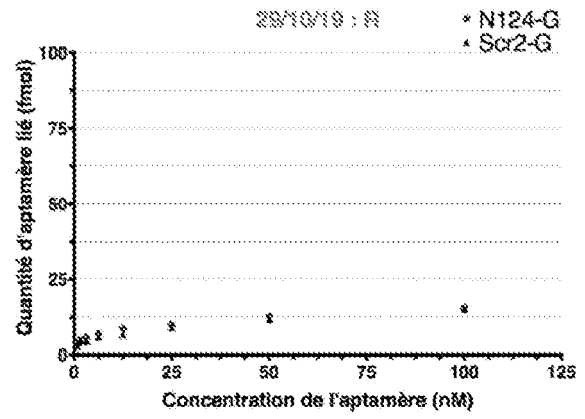
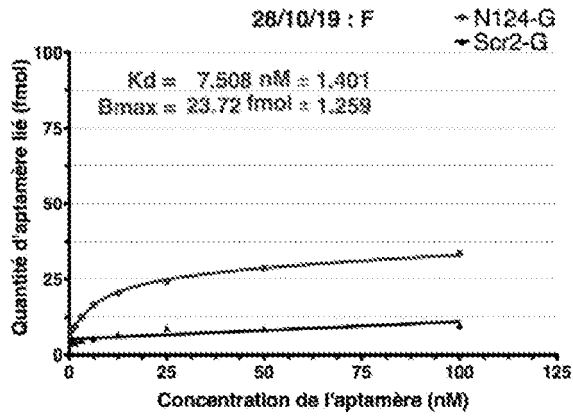
[Fig. 3]



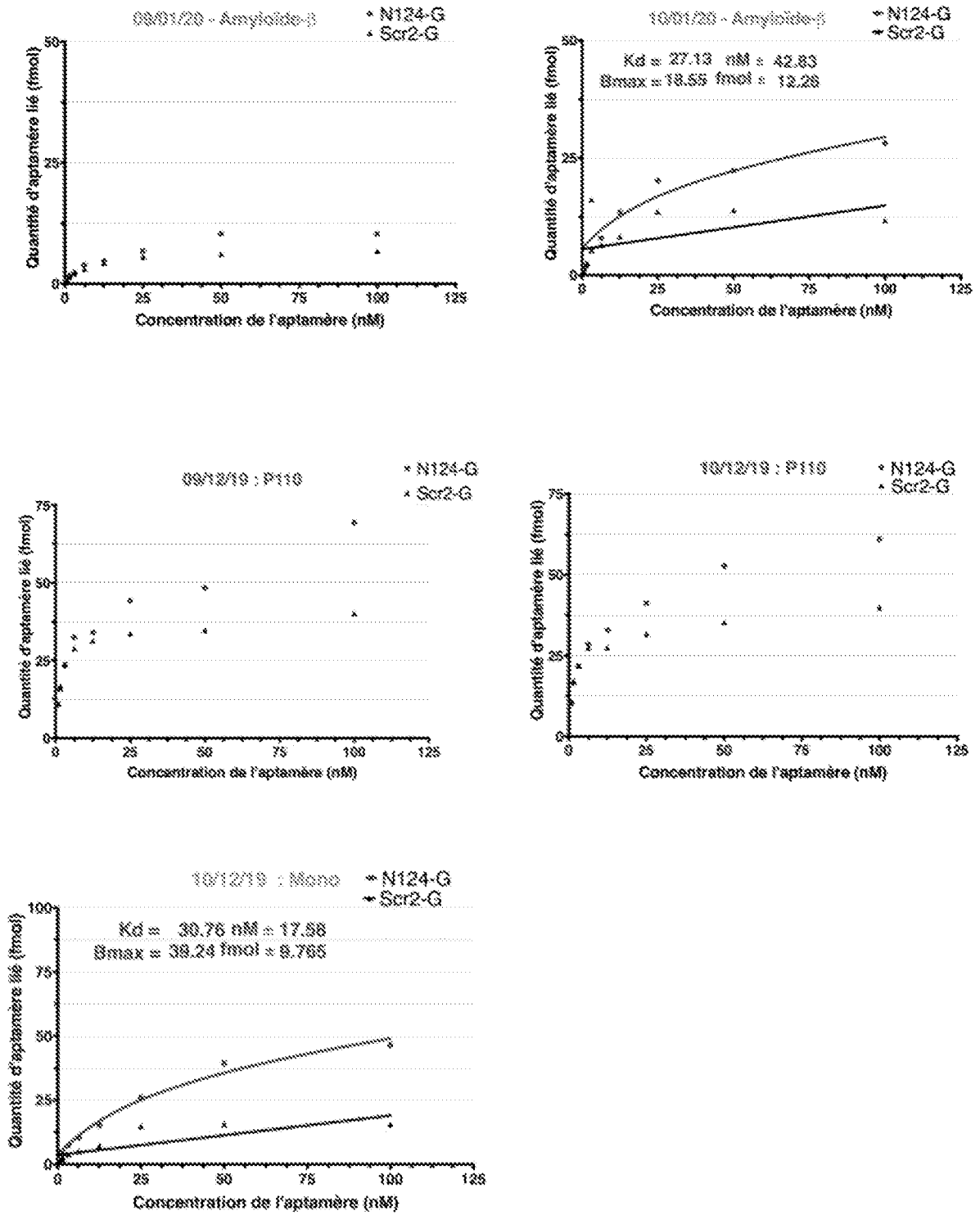
[Fig. 4]



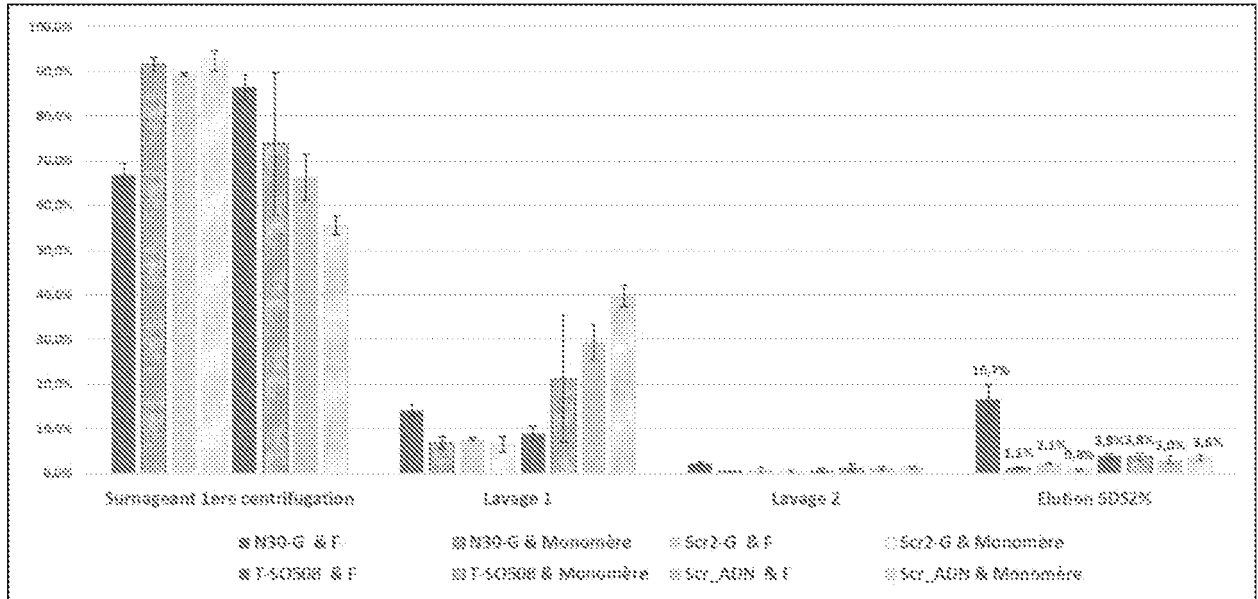
[Fig. 5]



[Fig. 6]

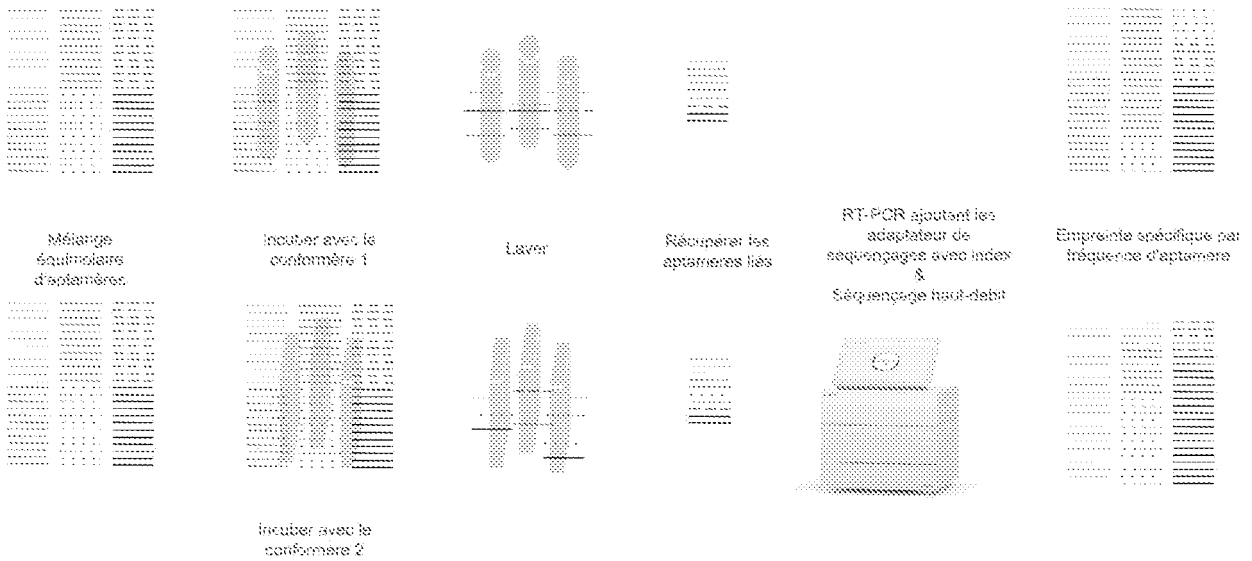


[Fig. 7]



[Fig. 8]

Empreinte moléculaire par séquençage de ligand d'aptamère (FootBAL-Seq)



SEQUENCE LISTING

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES
ALTERNATIVES
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)

<120> APTAMERES ARN SPECIFIQUES DE CONFORMERES DE FIBRES DE LA PROTEINE A-
SYNUCLEINE

<130> B252231FRD41159

<160> 69

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 35

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence spécifique de laptamère N30

<400> 1

ucgauccacg uccgacaacg cguuuacucg ccauc 35

<210> 2

<211> 35

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence spécifique de laptamère N124

<400> 2

uccgaccaug cuucaacuua uaccucgggg acugu 35

<210> 3

<211> 35

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence spécifique de laptamère N3

<400> 3

caacgcguuu accucacacc acgucauccg uugcc 35

<210> 4

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence spécifique de laptamère 4F02

<400> 4

gcuggcagca cgcaccgcug accgcuggcu gcacuaugcg uguggagugc 50

<210> 5

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence spécifique de laptamère 4F03

<400> 5

gcaacagacg caccguacac acaucuuggc cguuggcugc ccgaccagcc 50

<210> 6

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence spécifique de laptamère F124

<400> 6

cacggacacc uacccgacgg caugucagga cacauguugu gcuccgugug 50

<210> 7

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence spécifique de laptamère P65

<400> 7

cgcacagugu acaccuacac acagcauacc uguuggcauc ccagguugcc 50

<210> 8

<211> 35

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence spécifique de laptamère N0

<400> 8

ucaguccagu acgagacgcg uuuaccucca cugca 35

<210> 9
<211> 34
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence spécifique de laptamère N1

<400> 9
auccgaccaa cccaacgcu uuaccucacc ugca 34

<210> 10
<211> 35
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence spécifique de laptamère N2

<400> 10
uuccgaccgc cgcaacuuau agguaucggc cugca 35

<210> 11
<211> 35
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence spécifique de laptamère N4

<400> 11
acgcuuuac uccgcuagua cgaaccggaug gccc 35

<210> 12
<211> 35
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence spécifique de laptamère N5

<400> 12
agccaugcug ucaacuuuuu acucgucacc gcucg 35

<210> 13
<211> 35
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence spécifique de laptamère N15

<400> 13
aucggccaca gucgacaacu uugaaaucca ccugc 35

<210> 14
<211> 35
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence spécifique de laptamère N20

<400> 14
gcagcacaug accucacuu uuacucugcg cugca 35

<210> 15
<211> 35
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence spécifique de laptamère N37

<400> 15
ucaguccagc accaacgccg uuugcucugc acuac 35

<210> 16
<211> 35
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence spécifique de laptamère N62

<400> 16
guuuccgaac ggccaacuu ugaaaucucc gcccg 35

<210> 17
<211> 35
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence spécifique de laptamère N73

<400> 17
caacuugaaa uccaacccu gcagccgugu cuggu 35

<210> 18
<211> 35
<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence spécifique de laptamère N164

<400> 18

guuuccgacc acgacccaac guuacugccc accac 35

<210> 19

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence spécifique de laptamère 4F01

<400> 19

agcagcacac gaccagugug cccacacccc aguggugguc ugugguguc 50

<210> 20

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence spécifique de laptamère 4F04

<400> 20

ccguccacca gaccaacgua caaacuccgc ugguggucgc cuaccucggc 50

<210> 21

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence spécifique de laptamère 4F05

<400> 21

gccgcaggcu acaccacagc uccccuuca gcguguugug gauacucggc 50

<210> 22

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence spécifique de laptamère R01

<400> 22

ugccgcacua cagcuugguc ugcauauccu cugcgcacag cuccauguc 50

<210> 23
<211> 50
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence spécifique de laptamère R02

<400> 23
gcacgauguc caugaccaac uccagucacg gccucgacg guuaggcugu 50

<210> 24
<211> 50
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence spécifique de laptamère R03

<400> 24
ccagcaucac cagcggcacg acgucggacg gcuggcuggu ccgucaccgu 50

<210> 25
<211> 50
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence spécifique de laptamère R04

<400> 25
gcagagcuac acggugcaag uagcacgucc ugccaugcau gcagugcugc 50

<210> 26
<211> 50
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence spécifique de laptamère R05

<400> 26
cgggaagcag cacgacggcc ucaaugcacu ugccgguugg uuucggcugc 50

<210> 27
<211> 50
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence spécifique de laptamère R84

<400> 27
cugcgaagug cccaagacca uauccacugc acacgacagc ugaugguggc 50

<210> 28
<211> 50
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence spécifique de laptamère P91

<400> 28
gcuacacaca caucgcacgu cacccacuai ggggacaucu ugcggcgugc 50

<210> 29
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence amorce P72 des aptamères N, en 5

<400> 29
gggagaguau ccguugaggc uga 23

<210> 30
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence amorce P73 des aptamères 4F, F, R et P, en 5

<400> 30
gggagaguau ccguuggagg cau 23

<210> 31
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence amorce PiRT en 3

<400> 31
agaucggaag agcgucgugu agg 23

<210> 32
<211> 24
<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence G de 24 nts en 3

<400> 32

gcaaugcccc agcgugacug ccua 24

<210> 33

<211> 47

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence PiRT-G : combinaison amorce PiTR + séquence G, en 3

<400> 33

agaucggaag agcgucgugu agggcauugc cccagcguga cugccua 47

<210> 34

<211> 81

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère N30

<400> 34

gggagaguau ccguugaggc ugaucgaucc acguccgaca acgcuuuac ucgccaucag 60

aucggaagag cgucguguag g 81

<210> 35

<211> 81

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère N124

<400> 35

gggagaguau ccguugaggc ugaucggacc augcuucaac uuauaccucg gggacuguag 60

aucggaagag cgucguguag g 81

<210> 36

<211> 81

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère N3

<400> 36

gggagaguau ccguugaggc ugacaacgcg uuuaccucac accacgucan ccguugccag 60

aucggaagag cgucguguag g 81

<210> 37

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère 4F02

<400> 37

gggagaguau ccguuggagg caugcuggca gcacgcaccg cugaccgcug gcugcacuan 60

gcguguggag ugcagaucgg aagagcgucg uguagg 96

<210> 38

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère 4F03

<400> 38

gggagaguau ccguuggagg caugcaacag acgcaccgua cacacauuu ggcccguuggc 60

ugcccgacca gccagaucgg aagagcgucg uguagg 96

<210> 39

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère F124

<400> 39

gggagaguau ccguuggagg caucacggac accuacccga cggcauguca ggacacaugu 60

ugugcuccgu gugagaucgg aagagcgucg uguagg 96

<210> 40

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère P65

<400> 40

gggagaguau ccguuggagg caucgcacag uguacaccua cacacagcau accuguuggc 60

aucccagguu gcccagaucgg aagagcgucg uguagg 96

<210> 41

<211> 81

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère N0

<400> 41

gggagaguau ccguugaggc ugaucagucc aguacgagac gcguuuaccu ccacugcaag 60

aucggaagag cgucguguag g 81

<210> 42

<211> 80

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère N1

<400> 42

gggagaguau ccguugaggc ugaauccgac caaccaacg cguuuaccuc accugcaaga 60

ucggaagagc gucguguagg 80

<210> 43

<211> 81

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère N2

<400> 43

gggagaguau ccguugaggc ugaauccgac cgccgcaacu uauagguauc ccgcugcaag 60

aucggaagag cgucguguag g 81

<210> 44

<211> 81

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère N4

<400> 44

gggagaguau ccguugagggc ugaacgcguu uacuccgcua guacgaaccc gauugcccag 60

aucggaagag cgucguguag g 81

<210> 45

<211> 81

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère N5

<400> 45

gggagaguau ccguugagggc ugaagccaug cugucaacu uaaacucguc accgcucgag 60

aucggaagag cgucguguag g 81

<210> 46

<211> 81

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère N15

<400> 46

gggagaguau ccguugagggc ugaaucggcc acagucgaca acuuugaaau ccaccugcag 60

aucggaagag cgucguguag g 81

<210> 47

<211> 81

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère N20

<400> 47

gggagaguau ccguugagggc ugagcagcac augaccucac cuuuuacucu gcgugcaag 60

aucggaagag cgucguguag g 81

<210> 48

<211> 81

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère N37

<400> 48

gggagaguau ccguugaggc ugaucagucc agcaccaacg ccguuugcuc ucgacuacag 60

aucggaagag cgucguguag g 81

<210> 49

<211> 81

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère N62

<400> 49

gggagaguau ccguugaggc ugaguuuccg aacggcccaa cuuugaaauc cccgcccag 60

aucggaagag cgucguguag g 81

<210> 50

<211> 81

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère N73

<400> 50

gggagaguau ccguugaggc ugacaacuug aaaucccaac ccugcagccg ugucugguag 60

aucggaagag cgucguguag g 81

<210> 51

<211> 81

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère N164

<400> 51

gggagaguau ccguugaggc ugaguuuccg accacgaccc aacguuacug cccaccacag 60

aucggaagag cgucguguag g 81

<210> 52

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère 4F01

<400> 52

gggagaguau ccguuggagg cauagcagca cacgaccagu gugccccaca cccaguggug 60

gucuguggug ugcagaucgg aagagcgucg uguagg 96

<210> 53

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère 4F04

<400> 53

gggagaguau ccguuggagg cauccgucca ccagaccaac guacaaacuc cgcugguggu 60

cgccuaccu ggcagaucgg aagagcgucg uguagg 96

<210> 54

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère 4F05

<400> 54

gggagaguau ccguuggagg caugccgcag gcuacaccac agcuucccu ucagcguguu 60

guggauacuc ggcagaucgg aagagcgucg uguagg 96

<210> 55

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère R01

<400> 55

gggagaguau ccguuggagg cauugccgca cuacagcuug gucugcauau ccucugcgca 60

cagcucaug ugcagaucgg aagagcgucg uguagg 96

<210> 56

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère R02

<400> 56

gggagaguau ccguuggagg caugcacgau guccaugacc aacuccaguc acggcccugc 60

agcguuaggc uguagaucgg aagagcgucg uguagg 96

<210> 57

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère R03

<400> 57

gggagaguau ccguuggagg cauccagcau caccagcggc acgacgucgg acggcuggcu 60

gguccgucac cguagaucgg aagagcgucg uguagg 96

<210> 58

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère R04

<400> 58

gggagaguau ccguuggagg caugcagagc uacacggugc aaguagcacg uccugccaug 60

caugcagugc ugcagaucgg aagagcgucg uguagg 96

<210> 59

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère R05

<400> 59

gggagaguau ccguuggagg caucgggaag cagcacgacg gccucaaugc acuugccggu 60

ugguuucggc ugcagaucgg aagagcgucg uguagg 96

<210> 60

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère R84

<400> 60

gggagaguau ccguuggagg caucugcgaa gugcccaaga ccuaauccac ugcacacgac 60

agcugauggu ggcagaucgg aagagcgucg uguagg 96

<210> 61

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence complète de laptamère P91

<400> 61

gggagaguau ccguuggagg caugcuacac acacaucgca cgucacccac uauggggaca 60

ucuugcggcg ugcagaucgg aagagcgucg uguagg 96

<210> 62

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence aptamère aléatoire Scr-1

<400> 62

gggagaguau ccguuggagg cauaucguuc agcgugggau cugcuacaac uccugagugc 60

uacauguacg agaagaucgg aagagcgucg uguagg 96

<210> 63

<211> 81

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence aptamère aléatoire Scr-2

<400> 63

gggagaguau ccguugaggc ugauucaaca ccguuugacg uucuugguau cggaagacag 60

aucggaagag cgucguguag g 81

<210> 64

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence aptamère ADN aléatoire SCRAMBLE

<400> 64

aatgatacgg cgaccaccga gatctacact ctttcctac acgacgctct tccgatct 58

<210> 65

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence aptamère ADN art antérieur M5-15

<400> 65

atagcccat cattcattgt atggtacggc gcggtggcgg gtgcgtggag atattagcaa 60

gtgtca 66

<210> 66

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence aptamère ADN art antérieur T-SO508

<400> 66

atactgcat tcatttcatt tgctgtggt gttggggcgg gtgcgttag atacagcat 60

gtgtca 66

<210> 67

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence aptamère ADN art antérieur F5R1

<400> 67

atcgagtgtg tacgggtcc ggtagggtgg cgaggtcttc ctgctgtagc aggatcca 58

<210> 68

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Séquence aptamère ADN art antérieur F5R2

<400> 68

atcgagtga cgagtgcctc cggtagcagc tgtctgatgg gttgvcgvc aggatcca 58

<210> 69
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Séquence aptamère ADN art antérieur Tau 3146

<400> 69
gcctgttg agcctcctgt cgaaccttg ggggtggcttg acgaagaaag tagttgagcg 60
tttattcttg tctccc 76

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

NEANT

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

LANDUREAU MAUD ET AL: "The differential solvent exposure of N-terminal residues provides "fingerprints" of alpha-synuclein fibrillar polymorphs",
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,
vol. 296, 30 avril 2021 (2021-04-30), page 100737, XP055884384,
US

ISSN: 0021-9258, DOI:
10.1016/j.jbc.2021.100737

Extrait de l'Internet:

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8163981/pdf/main.pdf>

JUNG BYUNG CHUL ET AL: "Amplification of distinct [alpha]-synuclein fibril conformers through protein misfolding cyclic amplification",
EXPERIMENTAL & MOLECULAR MEDICINE,
vol. 49, no. 4, E314,
1 avril 2017 (2017-04-01), pages 1-8,
XP055884393,

DOI: 10.1038/emm.2017.1

Extrait de l'Internet:

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5420798/pdf/emm20171a.pdf>

VAN DER PERREN ANKE ET AL: "The structural differences between patient-derived [alpha]-synuclein strains dictate characteristics of Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies",
ACTA NEUROPATHOLOGICA,
vol. 139, no. 6,

30 avril 2020 (2020-04-30), pages 977-1000, XP037145476,

ISSN: 0001-6322, DOI:

10.1007/S00401-020-02157-3

[extrait le 2020-04-30]

KLINGSTEDT THERESE ET AL: "Luminescent conjugated oligothiophenes distinguish between alpha-synuclein assemblies of

Parkinson's disease and multiple system atrophy",
ACTA NEUROPATHOLOGICA COMMUNICATIONS,
vol. 7, no. 1, 193,
3 décembre 2019 (2019-12-03), pages 1-9,
XP055884467,

WO 2019/079887 A1 (CARLETON UNIV [CA])
2 mai 2019 (2019-05-02)

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND
DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT