

Ingénierie de fragments d'anticorps de camélidés (nanobodies) capables de reconnaître des ARNs structurés

Auteur : Cawez, Frédéric

Promoteur(s) : Galleni, Moreno

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

Année académique : 2016-2017

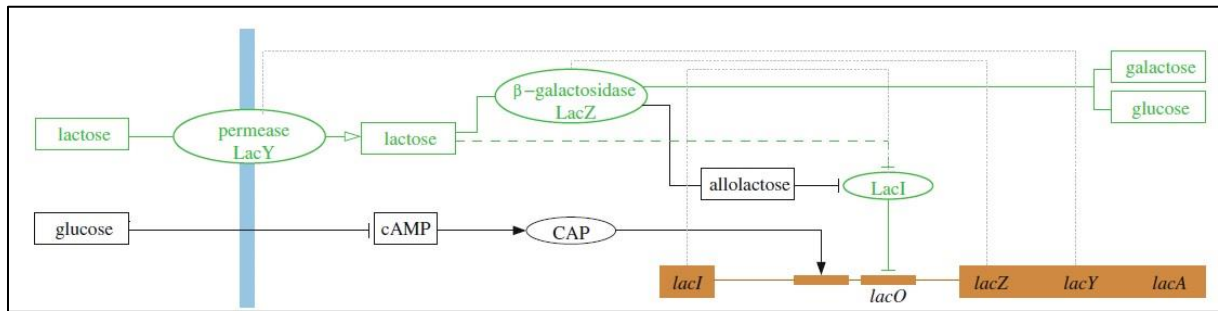
URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/3362>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

ANNEXES



Annexe 1 : Représentation schématique du contrôle de l'opéron lactose chez les bactéries. D'une part, le lactose, sous sa forme allolactose, est capable d'interagir avec LacI bloquant son action inhibitrice au niveau de l'opérateur LacO du promoteur Lac. D'autre part, le glucose agit comme inhibiteur en bloquant la voie de synthèse de l'AMPc qui, transformé en protéine CAP, assure une transcription plus importante des gènes de l'opéron lactose [28].

G22 :

GCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCAGCACTGTGGGAGGCTGAGGAGGGAGGATTGCTCGAGCTCAGGAGTTCGAGACTCGCCTGAGCGAAAGTGAGACCCGACTCATTAAAAAATGAAAAACCCAGCCGGGCGCCGCGGCGAGCGCCTGTAATCCAGCGGCCTCGGAGGCTGAGGCAGCAGGATGCCCGCAGCCGAGTCTGAGGTTGACGTGGGCTCCGGTGCCACTGCCCTCTGCTCAGGGCACAGGGTGAACCTCTGTCTCGACAAAAA

φBC1 :

AAGGAGTTGGGGATTTAGCTCAGTGGTAGAATGCTTGCCTAGCAAGCGCAAGGCCCTGGGTTTCAGTCCTCAGCTCTGTGAAAGGAAAAA
AAAAGACAAAATAAATAATTTAGGAAGTATATGTTAATTGAGGGAAAGAATATAAGTAAATCAAATTACATCATTATT

BC1 :

GGGGTTGGGGATTTAGCTCAGTGGTAGAGCGCTTGCCTAGCAAGCGCAAGGCCCTGGGTTTCGGTCCTCAGCTCTGGAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAGACAAAATAACAAAAAGACCAAAAAAAAAACAAGGTAAGTGGCACACACAACCTTT

Ribozyme glmS :

AAGCGCCAGAACTGGCACCATTGCACTCCGGTGCCAGTTGACGAGGTGGGGTTTATCGAGATTCGGCGGATGACTCCCGTTGTTTCAT
CACAACCGCAAGCTTTTACTTAAATCATTAAAGTGACTTAGTGGACAAAGGTGAAAGTGTGATGACGAGCAGGCCTGCGGAAT

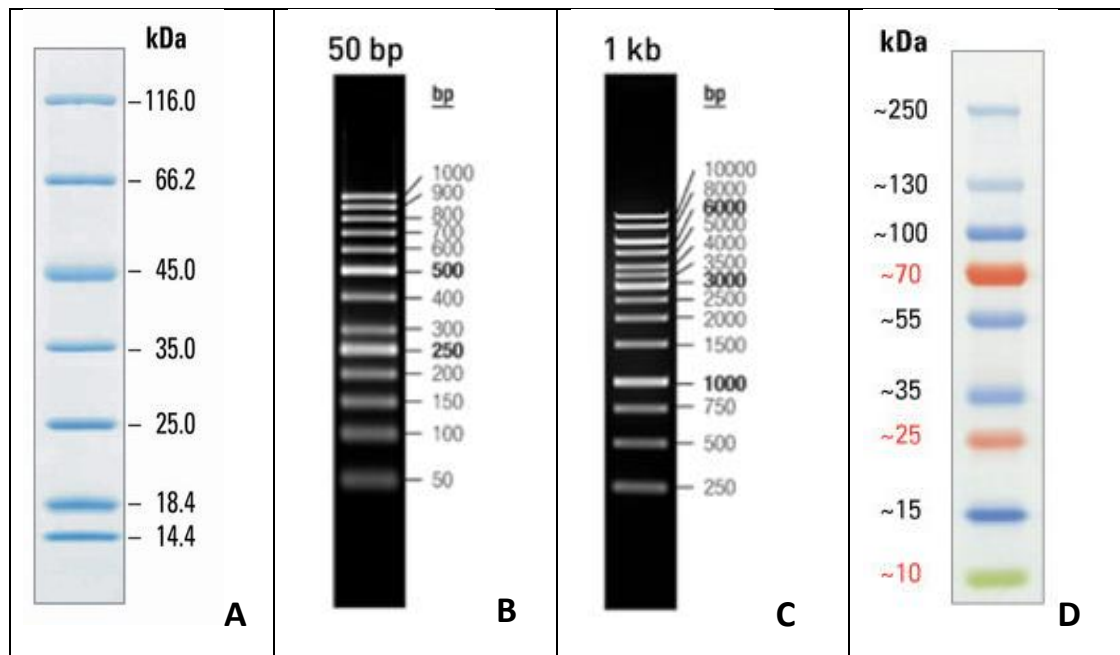
P4P6 :

GGAATTGCGGGAAAGGGTCAACAGCCGTTTCAGTACCAAGTCTCAGGGGAACTTTGAGATGGCCTTGCAAAGGGTATGGTAATAAGC
TGACGGACATGGTCCTAACACGCAGCAAGTCTAAGTCAACAGATCTTCTGTTGATATGGATGCAGTTCA

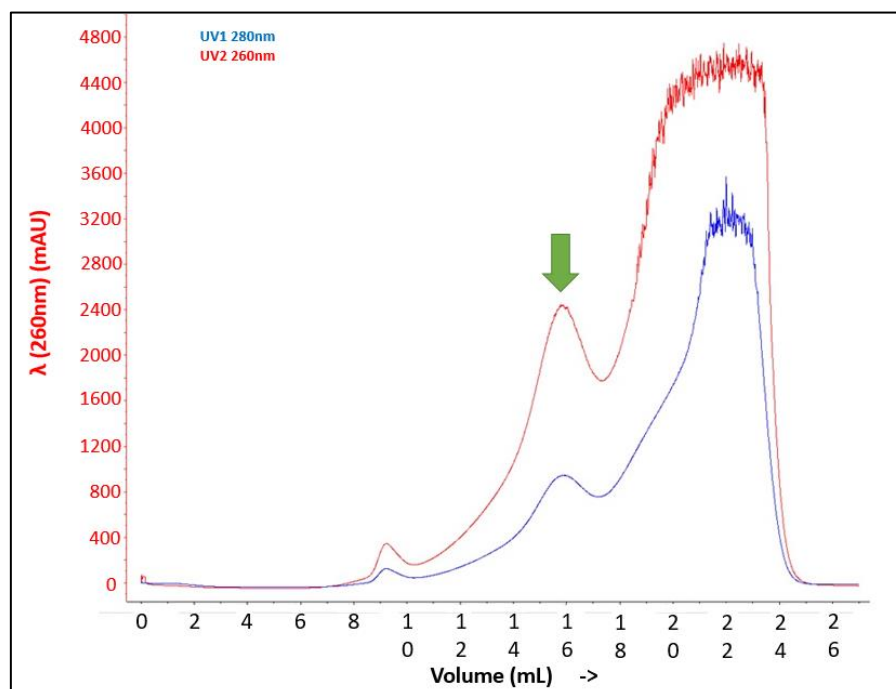
φBC1-rib_{glmS} :

AAGGAGTTGGGGATTTAGCTCAGTGGTAGAATGCTTGCCTAGCAAGCGCAAGGCCCTGGGTTTCAGTCCTCAGCTCTGTGAAAGGAAAAA
AAAAGACAAAATAAATAATTTAGGAAGTATATGTTAATTGAGGGAAAGAATATAAGTAAATCAAATTACATCATTATTA
AAAGGATCCAAGCGCCAGAACTGGCACCATTGCACTCCGGTGCCAGTTGACGAGGTGGGGTTTATCGAGATTCGGCGGATGACTCCCG
GTTGTTTCATCACAACCGCAAGCTTTTACTTAAATCATTAAAGTGACTTAGTGGACAAAGGTGAAAGTGTGATGACGAGCAGGCCTGCGG
AAT

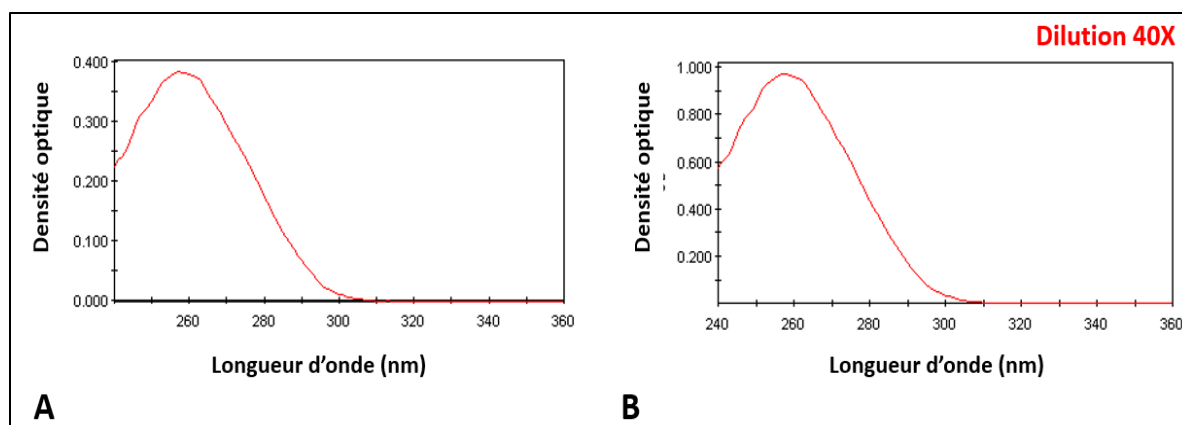
Annexe 2 : Séquences d'ADN des différents ARN_{st} utilisés.



Annexe 3 : Poids moléculaires utilisés dans le cadre de migration sur gel : Unstained Protein MW Marker de Thermo Scientific™ Pierce™ pour les gels SDS (A) ; O'Gene Ruler DNA Ladder 50pb de BIOGEN PRAHA pour les tests d'activité du ribozyme glmS (B) ; O'Gene Ruler DNA Ladder 1Kb de BIOGEN PRAHA pour les essais de dénaturation chimique (C) ; Prestained Protein Ladder de Thermo Fisher Scientific pour les *Western Blot* (D).



Annexe 4 : Chromatogramme illustrant l'élution de 500 μ L de produits de transcription à large échelle. Le volume mort de la colonne se situe aux alentours de 9 mL. L'absorbance à 260 nm (rouge) a été suivie pour vérifier la présence de l'ARN ϕ BC1-rib_{glmS} dans la solution tandis que l'absorbance à 280 nm (bleue) permet de vérifier la contamination par des protéines. La flèche verte représente le pic correspondant à l'élution de ϕ BC1-rib_{glmS}.



Annexe 5 : Spectre d'absorbance UV entre 240 et 340 nm d'une solution en transcrits (transcriptions in vitro à large échelle) purifiée par tamis moléculaire (A) et d'une solution purifiée par une colonne Roche (transcription in vitro à courte échelle) (B). Les spectres ont été réalisés en utilisant 170 μ L d'une solution stock en transcrits pour le spectre A, tandis qu'une dilution 40 fois a été réalisée pour la mesure du spectre B. Les spectres de la solution tampon correspondante a été également mesuré et utilisé comme blanc.

Analyte	Concentration (nM)	Ligand	Dilution	Concentration EDTA (mM)
ϕ BC1-rib	100	B03	500X	X
ϕ BC1-rib	100	B90	250X	X
ϕ BC1-rib	100	B03	500X	10
ϕ BC1-rib	100	B90	250X	10
ϕ BC1-rib	100	B20	X	X
BSA	100	B03	500X	X
BSA	100	B90	250X	X
ARN polyA	100	B03	500X	X
ARN polyA	100	B90	250X	X

Annexe 6 : Ensemble des conditions mises en place dans le cadre de l'étude de l'interaction des différents clones sélectionnés par phage display avec l'ARN ϕ BC1-rib_{glmS} ainsi qu'avec différents contrôles.

Analyte	Concentration (nM)	Ligand	Concentration (μ g/mL)	Conditions expérimentales en présence de :
PolyA	100	B03	1	MgCl ₂
PolyU	100	B03	1	MgCl ₂
BSA	100	B03	1	MgCl ₂
ADNds	100	B03	1	MgCl ₂
ADNss	100	B03	1	MgCl ₂
ϕ BC1-rib	100	B03	1	MgCl ₂
ϕ BC1-rib	100	B03	1	EDTA
ϕ BC1-rib	100	B03	1	MgCl ₂
ϕ BC1-rib	100	B03	1	EDTA

φBC1	100	B03	1	MgCl ₂
φBC1	100	B03	1	EDTA
rib	100	B03	1	MgCl ₂
rib	100	B03	1	EDTA
BC1	100	B03	1	MgCl ₂
BC1	100	B03	1	EDTA
7SK	100	B03	1	MgCl ₂
7SK	100	B03	1	EDTA
P4P6-rib	100	B03	1	MgCl ₂
P4P6-rib	100	B03	1	EDTA
P4P6	100	B03	1	MgCl ₂
P4P6	100	B03	1	EDTA
G22	100	B03	1	MgCl ₂
G22	100	B03	1	EDTA

Annexe 7 : Ensemble des conditions mises en place dans le cadre de l'étude de la spécificité du nanobody B03 contre un ARN_{st} (analytes en vert) et contre φBC1-rib_{glms} (analyte en orange).

	ARN (Ci = 17,2μM)	Nanobody (Ci = 12,7μM)	G6P (Ci = 10 mM)	RI (40U/μL)	Tampon
ARN	2,6 μL	X	X	1 ul	12,4 μL
ARN + G6P	2,6 μL	X	1 μL	1	11,4 μL
Ratio 1 : 1	2,6 μL	3,5 μL	X	1	7,9 μL
Ratio 1 : 1 + G6P	2,6 μL	3,5 μL	1 μL	1	6,9 μL
Ratio 1 : 2	2,6 μL	7 μL	X	1	4,4 μL
Ratio 1 : 2 + G6P	2,6 μL	7 μL	1 μL	1	3,4 μL
Ratio 1 : 3	2,6 μL	10,5 μL	X	1	0,9 μL
Ratio 1 : 3 + G6P	2,6 μL	10,5 μL	1 μL	1	X

Annexe 8 : Préparation des échantillons en vue des tests d'activité du ribozymes glms précédés d'un cycle de dénaturation-renaturation ou sans un cycle de dénaturation-renaturation.

Annexe 9 : Profils d'association et de dissociation du nanobody B03 avec ϕ BC1-rib_{glmS} (bleu), ϕ BC1 (magenta), le ribozyme glmS (bleu clair) ainsi qu'avec deux ARNs_{st} contrôles que sont P4P6 (159 nt) (orange) et G22 (283 nt) (rouge). Les associations et les dissociations ont été mesurées sur un temps de 600 secondes. Cette expérience a été réalisée au moins deux fois de manière indépendante et a eu recours à une solution tampon suppléée en EDTA. Les concentrations en protéines et en ARNs utilisées sont respectivement de 58 nM et de 100 nM.

Annexe 10 : Structures secondaires de BC1 prédites par le programme bioinformatique *RNAfold web server* (A) et déterminées expérimentalement par tests enzymatiques (B). La comparaison des deux montre clairement une forte ressemblance de structure justifiant la fiabilité du programme bioinformatique utilisé.