

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>

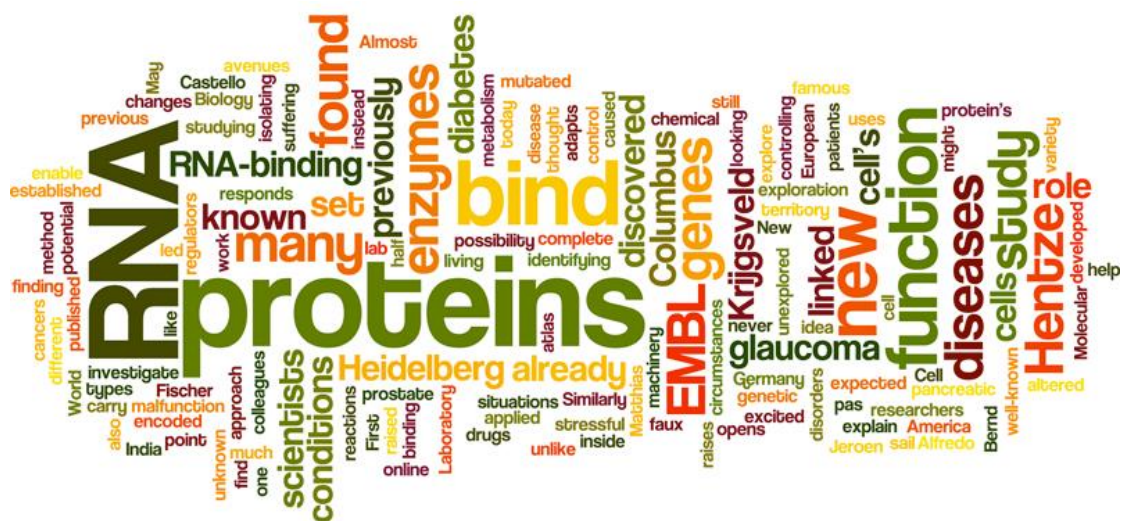
Avertissement à l'attention des usagers :

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.

Laboratoire des Macromolécules Biologiques

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

**Année académique 2016 - 2017**

Remerciements

Arrivé aux termes de ce mémoire, je me devais de faire des remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Pour commencer, j'aimerais remercier le professeur Moreno Galleni pour son accueil au sein de son laboratoire ainsi que pour toutes les technologies mises à ma disposition.

Je tiens à tout particulièrement à remercier le Docteur Marylène Vandevenne pour toute l'aide qu'elle m'a apporté et tout le savoir qu'elle a pu faire partager. Cela fait plus d'un an que nous travaillons ensemble et je pense que je peux dire, avec toute honnêteté, que Marylène est la personne qui m'a réellement donné le goût pour les sciences. Toutes nos discussions plus qu'attrayantes, les expériences que nous avons réalisé en équipe font que tout était davantage enrichissant au fur et à mesure de mon mémoire. Elle m'a réellement permis de devenir autonome et a toujours fait preuve de pédagogie et ce, même dans les moments difficiles. De même, je tiens à la remercier pour toutes les corrections qu'elle a pu apporter dans mon mémoire et je souhaite, dans le meilleur des cas, pouvoir continuer à travailler avec elle dans le futur.

Je tiens à remercier également toute l'équipe du CIP et en particulier Moray Joel, Dondelinger Mathieu, Duray Elodie, Vaneyck Jonathan, Blétard Sylvie et Anderssen Sinaeda à la fois pour leurs petits conseils en purification, mais également pour les excellents moments passés sur les temps de midi et en soirée.

Je tenais à remercier les membres de mon jury à savoir le professeur Moreno Galleni, le professeur Paulette Charlier, le professeur Frédéric Kerff ainsi que le professeur André Matagne pour le temps consacré à la lecture de mon mémoire ainsi que leur intervention enrichissante dans la discussion orale.

Je tenais à remercier également tous mes amis et en particulier Iovino Margaud, Amandine Boeckx, Natalie Defossé, Arnaud Maessen et Jennifer Foster pour tous les fous rires que nous avons pu avoir ensemble et qui m'ont permis de tenir durant l'ensemble de mon mémoire. De même, j'aimerais remercier toute ma famille pour leur soutien et tous leurs encouragements. J'espère les rendre fiers de moi.

Enfin, je remercie ma copine Pauline Christophe pour son soutien et ce, tous les jours même pendant la rédaction de son propre mémoire. Elle m'a réellement permis de tenir le coup jusqu'au bout et pour ça, je ne la remercierai jamais assez. Je tenais également à remercier ma littéraire préférée, Delphine Christophe, pour toutes ses corrections orthographiques.

Liste d'abréviations

AA : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

ADN_c : ADN complémentaire

ADN_{ds} : *ADN double strand*

ADN_{ss} : *ADN single strand*

Amp : ampicilline

ARN : acide ribonucléique

ARN_m : ARN messenger

ARN_{nc} : ARN non codant

ARN_{ss} : *ARN single strand*

ARN_{st} : ARN structuré

BSA (« *Bovine serum albumin* ») : albumine de sérum de bovin

CD : dichroïsme circulaire

CH/CL : domaine constant de la chaîne lourde/légère

CDR : *complementary-determining region*

DMSO : diméthylsulfoxyde

DTT : Dithiothréitol

E.coli : *Escherichia coli*

EDTA : éthylène-diamine-tétra-acétique

EIF4 : *Eukaryotic initiation factors*

ELISAs ("*Enzyme-Linked Immunosorbant Assays*") : dosage immuno-enzymatique sur support solide

F_{ab} ("*smaller antigen-binding fragment*") : fragment d'anticorps de liaison à l'antigène

F_c : fraction constante

FP : fraction périsplasmique

FR : Framework

FT (« *Flow-Through* ») : fraction non accrochée

GlcN6P : glucosamine-6-phosphate

GlmS : glucosamine-6-phosphate synthase

HA : hémagglutinine

HCAb : *only heavy-chain antibody*

His : histidine

IMAC ("*Immobilized Metal Affinity Chromatography*") : chromatographie d'affinité par immobilisation d'un métal

ITC (« Isothermal Titration Calorimetry ») : calorimétrie de titration isotherme

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

KDa : Kilodalton

LB : *lysogeny broth*

lncRNA : *long non-coding RNA*

miARN : micro ARN

MPa : mégapascal

Nb : nanobody

Nt : nucléotide

NTP ("*nucleoside triphosphate*") : nucléoside triphosphaté

ON : overnight

Pb : paire de bases

PDB (« Protein Data Bank ») : base de données de protéines

RI : RNase inhibiteur

RNase : ribonucléase

RNP : ribonucléoprotéine

rib_{gls} : ribozyme gls

scFv ("*single-chain variable domain*") : fragment simple chaîne de la partie variable d'Ac

SDS-PAGE : Électrophorèse sur gel polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium

TB : *Terrific broth*

TEA : Triethanolamine

TES : TRIS-EDTA-Sucrose

T_m : température de demi-dénaturation thermique

TRIM (« trinucleotide gene synthesis ») : synthèse de gènes à partir de trinuécléotides

TRIS : trishydroxyméthylaminométhane

UTR : *Untranslated Transcribed Region*

UV : ultraviolet

v/v : volume/volume

VH/VL : partie variable de la chaîne lourde/légère

V_HH : nanobody

VT1B : Verotoxin-1

3D : tridimensionnelle

1. INTRODUCTION	1
1.1. Les ARNs non codants, entre mythe et réalité	1
1.1.1. Les ARNs non codants : quelques généralités	1
1.1.2. Les ARNs non codants structurés	2
1.1.3. Les longs ARNs non codants (lncRNAs)	3
1.1.4. BC1 (Brain Cytoplasmic 1)	4
1.1.5. Les ARNs catalytiques (ribozymes)	4
1.2. Le nanobody, un anticorps qui fait parler de lui	5
1.2.1. Les anticorps : généralités	5
1.2.2. Structure d'un nanobody	6
1.2.3. Caractéristiques physico-chimiques des nanobodies	7
1.2.4. Méthodes d'ingénierie et de sélection de nanobodies	8
1.2.5. Ingénierie des nanobodies et domaines d'application	10
1.2.6. Co-cristallisation d'un ARNst assistée par un ou plusieurs nanobodies	11
2. Objectifs du travail	12
3. Matériel et méthodes	14
3.1. Constructions génétiques	14
3.1.1. Les phagémides et vecteur d'expression pHEN : caractéristiques générales	14
3.1.2. Sous-clonages des séquences codant pour les nanobodies dans le vecteur pHEN6	15
3.1.2.1. Digestion du plasmide pHEN6	15
3.1.2.2. Digestion du plasmide pHEN4 contenant les gènes des nanobodies d'intérêts	15
3.1.2.3. Ligation des gènes codant les nanobodies dans le vecteur pHEN6	16
3.1.3. Vecteur de type pUC57	16
3.2. Production et purification des nanobodies	17
3.2.1. Expression recombinante des nanobodies à partir des vecteurs pHEN4 et pHEN6	17
3.2.2. Purification des nanobodies exprimés à partir des vecteurs pHEN4 et pHEN6	18
3.2.2.1. Préparation d'extraits périsplasmiques	18
3.2.2.2. Lyse cellulaire	19
3.2.2.3. Purification par chromatographie d'affinité	19
3.2.2.4. Purification par chromatographie échangeuse de cations	20
3.2.3. Vérification de l'intégrité de nos nanobodies purifiés	21
3.3. Production et purification des ARNs	23
3.3.1. Transcription in vitro à faible échelle	23
3.3.2. Transcription in vitro à large échelle	23
3.3.3. Purification des produits de transcription	24
3.4. Tests d'interaction par interférométrie laser	25
3.4.1. Principe de l'interférométrie laser	25
3.4.2. Mesure d'interaction des nanobodies exprimés à partir du pHEN4 avec ϕ BC1-rib _{glmS}	26
3.4.3. Mesure d'interaction des nanobodies exprimés à partir du pHEN6 avec ϕ BC1-rib _{glmS}	27
3.5. Étude de l'effet stabilisant des nanobodies vis-à-vis de la dénaturation thermique de ϕBC1-rib_{glmS} par dichroïsme circulaire et par mesure d'activité catalytique du ribozyme glmS.	27
3.5.1. Étude de la stabilité thermique de ϕ BC1-rib _{glmS} par dichroïsme circulaire	27
3.5.1.1. Principe général du dichroïsme circulaire	27
3.5.1.2. Réalisation des spectres CD	28
3.5.1.3. Réalisation des courbes de dénaturation et de renaturation	29
3.5.2. Étude de la stabilité thermique de ϕ BC1-rib _{glmS} par mesure de l'activité catalytique du ribozyme glmS	29

3.6.	Étude de l'effet stabilisant des nanobodies vis-à-vis de la dénaturation chimique de ϕ BC1-rib _{glms} par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de DMSO.	30
4.	Résultats et discussions	31
4.1.	Production et purification des nanobodies sélectionnés par phage display à partir du vecteur pHEN4.....	31
4.2.	Mesure d'interaction de nos nanobodies B03, B20 et B90 avec l'ARN fusion ϕ BC1-rib _{glms} par interférométrie Laser (BLI)	32
4.3.	Sous-clonages des séquences codant pour les nanobodies B03 et B90 dans le vecteur pHEN6	32
4.4.	Expression du nanobody B03 à partir du vecteur pHEN6 et purification du nanobody par chromatographie d'affinité et chromatographie échangeuse de cations	33
4.4.1.	Purification de B03 à partir d'extraits périsplasmiques :	33
4.4.2.	Purification de B03 à partir de lysats cellulaires.....	34
4.4.2.1.	Purification par chromatographie d'affinité pour le nickel	34
4.4.2.2.	Purification par chromatographie échangeuse de cations.....	35
4.5.	Stabilisation du nanobody dans différentes conditions en tampon	36
4.6.	Etudes de la spécificité du nanobody B03 pour ϕ BC1-rib _{glms}	36
4.6.1.	Spécificité du nanobody B03 pour l'ARN _{st}	36
4.6.2.	Spécificité du nanobody B03 pour l'ARN _{st} ϕ BC1-rib _{glms}	37
4.7.	Quantification de l'affinité du nanobody B03 contre ϕ BC1-rib _{glms} et ϕ BC1	38
4.8.	Effet stabilisant du nanobody sur ϕ BC1-rib _{glms} vis-à-vis de la dénaturation thermique---	40
4.8.1.	Etude de la stabilité thermique de ϕ BC1-rib _{glms} par dichroïsme circulaire.....	40
4.8.1.1.	Etude de la stabilité du nanobody B03 par dichroïsme circulaire.....	40
4.8.1.1.1.	Spectre CD du nanobody B03	40
4.8.1.1.2.	Courbes de dénaturation et de renaturation du nanobody B03	41
4.8.1.1.3.	Comparaison des spectres CD du nanobody B03 avant dénaturation et après renaturation	42
4.8.1.2.	Etude de la stabilité de l'ARN ϕ BC1-rib _{glms} par dichroïsme circulaire.....	43
4.8.1.2.1.	Spectre de l'ARN ϕ BC1-rib _{glms}	43
4.8.1.2.2.	Comparaison des spectres CD de ϕ BC1-rib _{glms} seul et de l'ARN complexé en différents ratios molaires avec le nanobody B03.....	44
4.8.1.2.3.	Etude du comportement de dénaturation thermique de ϕ BC1-rib _{glms} seul ou complexé au nanobody B03 dans différents ratios molaires.....	44
4.8.2.	Etude de la stabilité thermique de ϕ BC1-rib _{glms} par test d'activité du ribozyme glms	46
4.9.	Effet stabilisant du nanobody sur ϕ BC1-rib _{glms} vis-à-vis de la dénaturation chimique ----	47
5.	Conclusions et perspectives	48

1. INTRODUCTION

Ce travail de fin d'étude a pris place dans le contexte d'un projet de recherche visant à développer des fragments d'anticorps capables de se fixer à l'ARN structuré et ce, dans le but de faciliter la cristallisation de cet ARN et d'en déterminer sa structure tridimensionnelle. Cette introduction est donc subdivisée en deux parties. La première décrit les connaissances actuelles des ARNs structurés tandis que la seconde se focalise sur l'ingénierie et la description de fragments d'anticorps.

1.1. Les ARNs non codants, entre mythe et réalité

1.1.1. Les ARNs non codants : quelques généralités

Jusqu'il y a peu, un des dogmes de la biologie a toujours considéré les ARNs comme des intermédiaires entre l'ADN et les protéines. Néanmoins, la comparaison du rapport entre le nombre de gènes et la quantité d'ADN d'un génome (nommé « *c-value* ») ne permet pas de mettre en évidence une relation linéaire entre la taille d'un génome et son nombre de gènes. Cette observation a été principalement démontrée pour des espèces très proches phylogénétiquement et correspond au « paradoxe de la *c-value* ». Ainsi, l'ADN n'encodant pas de gènes était généralement considéré comme du « *junk DNA* » qui n'aurait eu comme seule fonction une diversification des espèces [23]. Cependant, grâce aux récentes études transcriptomiques et protéomiques, nous savons maintenant qu'environ 90% du génome eucaryote est transcrit et seuls 2% de ces transcrits sont traduits en protéines [24]. De ce fait, ces transcrits ne codant pas pour des protéines sont appelés ARNs non codants (ARNs_{nc}) qui, contrairement aux idées perçues au début des années 50, sont très généralement associés à des fonctions biologiques importantes au sein des organismes [23].

Les ARNs_{nc} peuvent être répertoriés en deux catégories bien distinctes : les « *housekeeping RNAs* » et les « *regulatory RNAs* ». Les « *housekeeping RNAs* » reprennent tous les ARNs_{nc} qui sont exprimés de manière constitutive au sein d'une cellule tels les ARNs ribosomiaux et les ARNs de transfert. La deuxième catégorie correspond aux « *regulatory RNAs* » qui, comme leur nom l'indique, vont essentiellement intervenir au niveau de la régulation des gènes. Dans cette catégorie, une distinction doit être faite entre les petits ARNs_{nc} simples brins dont la longueur est inférieure à 200

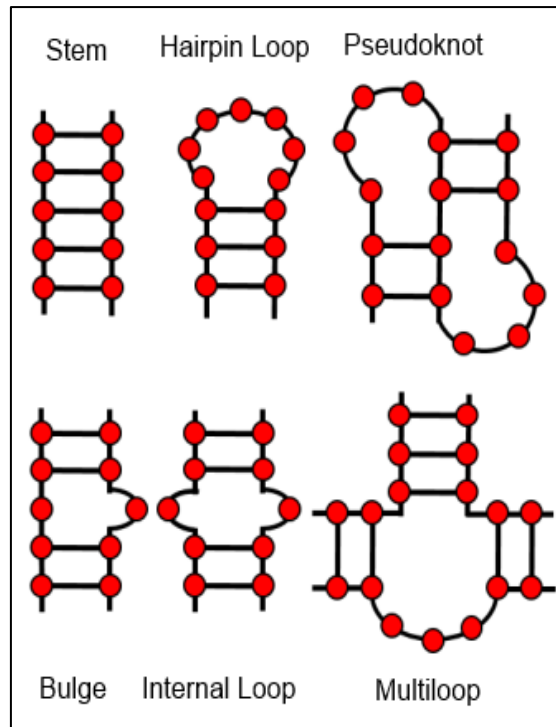


Figure 1 : Représentations schématiques des différents types de structures secondaires et tertiaires retrouvées chez les ARNs_{st}. Les structures secondaires incluent : la *stem* (duplex), l'*hairpin* (épingle à cheveux), le *bulge* (boucle latérale), le double *bulge* (boucle interne) et une boucle multiple reliant différentes structures secondaires. Ces éléments de structures secondaires interagissent entre eux pour former une structure tertiaire, la plus commune est le *pseudoknot* correspondant à un appariement des bases de deux *hairpins* antiparallèles [26].

nucléotides qui comprennent notamment les micro ARNs (miARNs), et les longs ARNs non codants (lncRNAs) dont la longueur est supérieure à 200 nucléotides et dont la plupart présentent une structure tridimensionnelle (ARNs structurés) qui assure leur fonction biologique [24,25].

1.1.2. Les ARNs non codants structurés

Les ARNs_{nc} sont associés à de nombreuses fonctions biologiques comme nous le verrons plus loin. De plus en plus d'évidences expérimentales associent directement ces fonctions à une structure précise adoptée par ces ARNs. En effet, l'alignement de séquences nucléotidiques des ARNs structurés (ARNs_{st}) ne permet pas de mettre en évidence une conservation de séquences alors que les structures secondaires et tertiaires correspondantes sont beaucoup plus conservées. Il est donc d'un grand intérêt de disposer de données structurales de ces ARNs_{st} afin de pouvoir plus efficacement prédire et comprendre les rôles biologiques qu'ils exercent au sein de la cellule [24].

La structure primaire d'un ARN_{nc} correspond à sa séquence en nucléotides, formée par les bases uridine (U), cytosine (C), guanine (G) et adénine (A). Les structures secondaires des ARNs_{nc} illustrent l'appariement des bases A-U et C-G selon les règles de *Watson and Crick* pour former des structures plus stables d'un point de vue thermodynamique (**Figure 1**). On y retrouve quelques structures telles que les *stems*, les *hairpins*, les *bulges*, les boucles internes et les boucles multiples [26]. Ces structures secondaires peuvent prendre des positions différentes les unes par rapport aux autres et interagir entre elles pour former une structure tridimensionnelle correspondant à la structure tertiaire de l'ARN. La plus connue des structures tertiaires est le *Pseudoknot*, qui correspond à l'interaction entre les bases de deux *hairpins* antiparallèles [26].

Dans le cadre de mon travail de fin d'étude, nous allons principalement nous intéresser aux ARNs_{st} d'une part, de par le manque de données expérimentales disponibles sur ces ARNs et d'autre part, de par l'intérêt grandissant pour les relations structure-fonctions étudiées au sein des ARNs_{nc}. En particulier, notre intérêt s'est porté sur deux ARNs_{st} que sont le ribozyme glms (rib_{glms}), qui appartient à la famille des ARNs catalytiques (ribozymes), et BC1, qui appartient à la famille des lncRNAs.

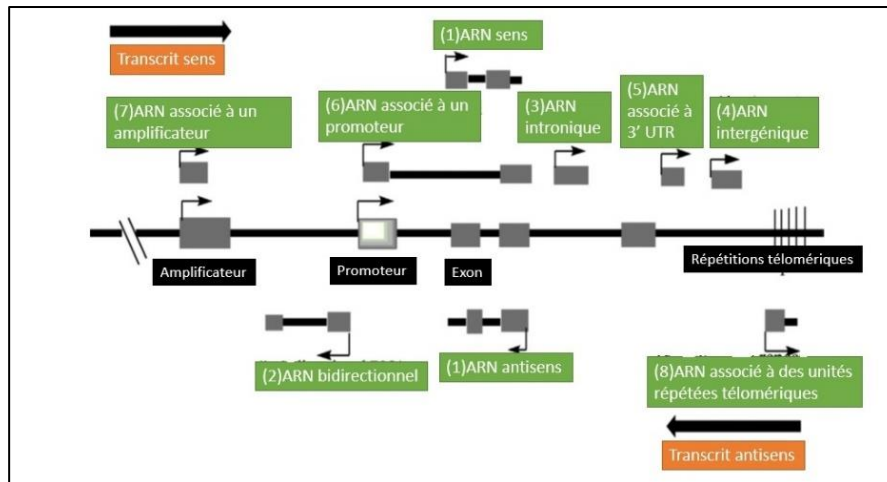


Figure 2 : Diagramme illustrant les différentes origines des LncRNAs. (1) ARN sens et antisens ; (2) ARN bidirectionnel ; (3) ARN d'origine intronique ; (4) ARN intergénique ; (5) ARN associé à l'extrémité non codante 3' UTR ; (6) ARN associé à un promoteur ; (7) ARN associé à une séquence amplificatrice ; (8) ARN transcrit à partir d'unités répétées télomériques [25].

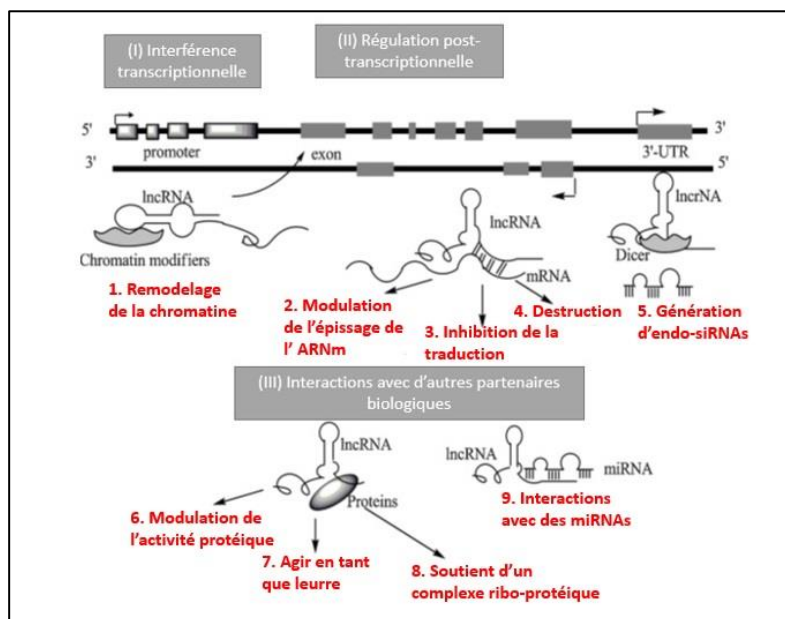


Figure 3 : Illustration des différentes fonctions biologiques associées aux LncRNAs au niveau transcriptionnel (I) par modification des histones et donc le remodelage de la chromatine (1) ; à l'échelle post-transcriptionnelle (II) par la régulation de l'épissage d'ARNm (2), l'inhibition de la traduction (3), la dégradation de l'ARNm (4) et la génération d'endo-siRNAs (5) ; son interaction avec différents partenaires biologiques (III) dans le but d'influencer l'activité du partenaire protéique (6), agir en tant que leurre (7), jouer un rôle de soutien d'un complexe ribonucléoprotéique (8) ou encore interagir avec des miRNAs (9) [25].

1.1.3. Les longs ARNs non codants (lncRNAs)

Comme mentionné ci-dessus, les lncRNAs font partie de la catégorie des ARNs régulateurs (« *regulatory RNAs* ») et la plupart sont probablement des ARNs_{st}. Leur longueur est généralement comprise entre 200 et 100 000 nucléotides. Ces molécules suscitent un intérêt important de par leur association à de nombreuses fonctions biologiques alors que leur dérégulation est, quant à elle, associée à de nombreuses pathologies. L'identification de nouveaux lncRNAs ne cessent de croître, notamment grâce aux techniques améliorées de *microarray* et de séquençage massif [25].

Les lncRNAs peuvent être transcrits à partir de différentes régions au sein du génome et il a été démontré que cette localisation était souvent liée à une fonction bien particulière. Tout d'abord, nous retrouvons des lncRNAs transcrits à partir de gènes codants pour des protéines comme les ARNs sens (**Figure 2.1**) qui, dans 70 % des cas, sont associés à un ARN antisens, les ARNs bidirectionnels (**Figure 2.2**) correspondant à un lncRNA transcrit à proximité et sur le bras opposé d'un autre transcrit codant pour une protéine, un lncRNA d'origine intronique (**Figure 2.3**) souvent associé à des cancers en cas d'une dérégulation et enfin, l'ARN intergénique (**Figure 2.4**) lorsque le transcrit est issu d'une région entre deux gènes. Ensuite, nous retrouvons également des transcrits provenant d'origines régulatrices comme les ARNs transcrits à partir d'une extrémité non traduite (UTR) (**Figure 2.5**), à partir d'un promoteur (**Figure 2.6**) en association directe avec le remodelage de la chromatine, et les ARNs associés à un amplificateur (**Figure 2.7**) formant très souvent des lncRNAs bidirectionnels. Enfin, certains ARNs sont directement issus de régions télomériques telles que les régions courtes répétées des télomères (**Figure 2.8**) [23,25].

Les lncRNAs interviennent essentiellement dans la régulation de certains gènes qui peut être réalisée à trois niveaux différents (**Figure 3**). Premièrement, ils peuvent directement interférer au niveau de la transcription en contrôlant notamment le remodelage de la chromatine. De plus, ils peuvent intervenir à l'échelle post-transcriptionnelle, principalement en affectant la traduction et l'épissage de certains ARNm. Enfin, ils peuvent également interagir avec de nombreux partenaires protéiques et nucléiques, ce qui influencent grandement certaines voies physiologiques par des changements de leur localisation cellulaire, en agissant comme soutien ou en les séquestrant [25]. En procédant de la sorte, les lncRNAs assurent de nombreuses fonctions biologiques, tout particulièrement au niveau du fonctionnement et du développement du système nerveux central. [25].

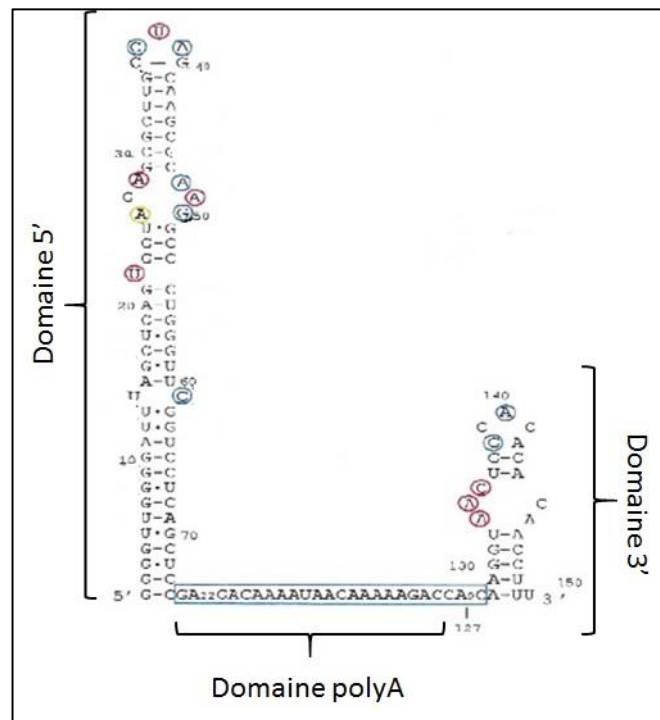


Figure 4 : Représentation schématique des structures secondaires de BC1. Ce dernier est divisé en 3 domaines distincts : un domaine 5' formé par une *hairpin* avec 3 *bulges* internes et une boucle externe ; un domaine central polyA ; un domaine 3' formé également par une *hairpin*, et comprenant un *bulge* interne ainsi qu'une boucle externe [19].

1.1.4. BC1 (Brain Cytoplasmic 1)

De nombreux travaux ont démontré que les ARNs_{nc} sont des régulateurs importants du fonctionnement du système nerveux central. En particulier, nombre d'entre eux agissent dans le cerveau en tant que régulateurs post-transcriptionnels et sont généralement désignés sous la terminologie de BC pour *Brain Cytoplasmic*. Ces ARNs_{nc} régulent l'expression spatio-temporelle de nombreuses protéines et la dérégulation de leur expression peut conduire à divers troubles neurodégénératifs [18].

Dans la cadre de ce projet de recherche, nous nous sommes focalisés sur un de ces ARNs_{nc} nommé BC1 (*Brain Cytoplasmic 1*). Il s'agit d'un lncRNA structuré murin exprimé principalement dans la partie dendritique des neurones post-synaptiques [20]. Son origine remonterait à 60 à 110 millions d'années et résulterait d'un phénomène de rétroposition d'un précurseur d'un ARN de transfert (tRNA^{Ala}). La structure tertiaire de cet ARN demeure non résolue à ce jour. Cependant, son contenu en structures secondaires a pu être déterminé expérimentalement par des méthodes enzymatiques et chimiques. Comme illustrée à la **figure 4**, la partie 5' de BC1 consiste essentiellement en une *hairpin*. De récentes études ont montré que cette *hairpin* serait impliquée dans le transport dendritique de l'ARN. De plus, nous retrouvons un domaine central polyA (A₂₁) qui marque une séparation entre le domaine 5' et un domaine 3', formé également par une *hairpin* plus petite que le domaine 5' et qui intervient dans l'interaction avec les différents partenaires protéiques de BC1 [19].

BC1 est connu pour être un répresseur traductionnel. En effet, il est capable d'interagir essentiellement avec deux facteurs d'initiation de la traduction au niveau de son domaine 3', à savoir les facteurs EIF4A et EIF4B, formant ainsi un complexe capable d'inhiber la formation du complexe d'initiation 48S et régulant ainsi la traduction de certaines protéines dans des microdomaines post-synaptiques de neurones [18,20].

1.1.5. Les ARNs catalytiques (ribozymes)

Dans la catégorie des ARNs_{st}, nous retrouvons la famille des ribozymes. Ces derniers sont capables de catalyser une réaction biochimique. Classés dans la famille des ribozymes, les riboswitches sont des ribozymes qui possèdent une activité catalytique modulable par la liaison d'un ligand correspondant généralement à un ion métallique ou à un métabolite. La plupart de ces riboswitches contrôlent l'expression de gènes en *cis* et sont situés dans la région 5' non traduite (UTR) de ces gènes.

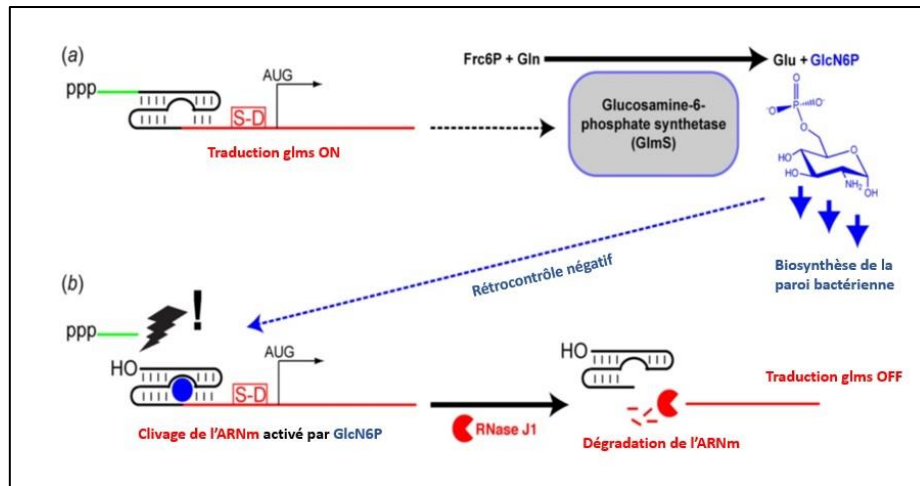


Figure 5 : Représentation schématique de la régulation en *cis* de la synthèse de Glucosamine-6-Phosphate (Glc6P) par le riboswitch *glms*. (A) Production de GlcN6P par l'enzyme GlcN6P synthase (GlmS) encodée par le gène *glms* ; (B) Rétro-control négatif par interaction du GlcN6P avec le ribozyme *glms* entraînant une dégradation de l'ARNm codant pour l'enzyme GlmS, diminuant ainsi le taux de GlcN6P au niveau physiologique [22].

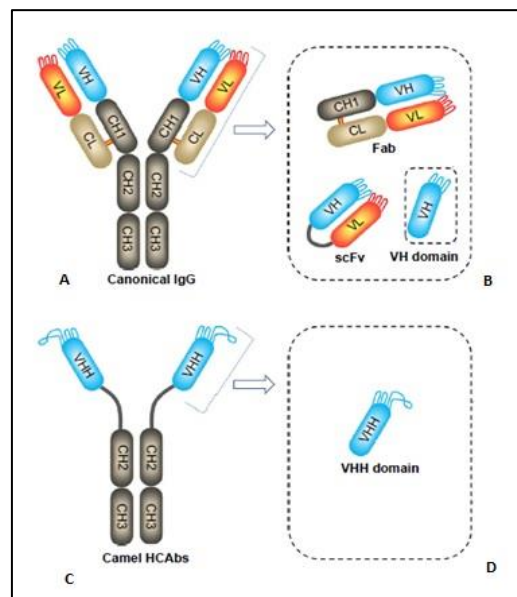


Figure 6 : Schémas représentant une immunoglobuline classique, un HCAbs de camélidé ainsi que les fragments d'anticorps correspondants (A) IgG classique présentant deux chaînes lourdes et deux chaînes légères ; (B) représentation d'un F_{ab} (domaine variable VL et VH et domaine constant CH1 et CL), d'un scFv (domaines variables VH et VL associés par un linker) et d'un domaine VH ; (C) HCAbs d'un camélidé portant deux chaînes lourdes avec deux domaines constants (CH2, CH3) et un domaine variable VHH ; (D) nanobody (VHH) [1].

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes focalisés sur le riboswitch *glms*, un ribozyme conservé chez les bactéries à Gram positif et localisé dans la région 5' UTR du gène *glms*. Ce gène code pour la glucosamine-6-phosphate (GlcN6P) synthetase (GlmS), une enzyme catalysant la formation de glutamate et de GlcN6P à partir de fructose-6-phosphate et de glutamine, le GlcN6P intervenant dans la formation de la paroi bactérienne (**Figure 5A**) [22]. Lorsque la concentration de GlcN6P devient trop importante au niveau physiologique, ce dernier est capable d'aller se fixer sur le ribozyme *glms*, entraînant l'auto-clivage de celui-ci et ainsi la dégradation de l'ARNm codant pour la GlmS par la RNase J1 (**Figure 5B**) [21,22].

1.2. Le nanobody, un anticorps qui fait parler de lui

1.2.1. Les anticorps : généralités

Les anticorps sont des protéines complexes du système immunitaire adaptatif qui sont produites par les lymphocytes B afin de détecter et neutraliser un agent pathogène. Depuis de nombreuses années, les scientifiques se sont intéressés à l'ingénierie d'anticorps afin de développer de nouveaux outils aussi bien pour la recherche fondamentale que pour la production d'agents thérapeutiques.

Tous les vertébrés produisent des anticorps dénommés « conventionnels », formés par deux chaînes lourdes et deux chaînes légères (**Figure 6A**). La chaîne lourde contient 3 domaines constants (CH1, CH2, CH3) ainsi qu'un domaine variable (VH), tandis que la chaîne légère contient un domaine constant (CL) qui interagit avec le domaine constant CH1 par un pont disulfure et un domaine variable (VL) [1]. Cependant, l'utilisation de ces immunoglobulines dans leur intégralité reste compliquée car elles sont assez volumineuses (150KDa), fortement immunogènes et leur temps de demi-vie dans le sérum est très long ce qui peut devenir toxique pour l'organisme [2,3]. De ce fait, depuis quelques années, les scientifiques préfèrent utiliser des fragments d'anticorps (**Figure 6B**) tels que les « *F_{abs}* » (57KDa) ou les « *scFvs* » (27KDa) qui, malgré leur petite taille, présentent certains inconvénients comme une tendance à s'oligomériser, des procédés de production complexes avec de faibles rendements, une solubilité limitée et une certaine sensibilité face à la température et aux variations de pH.

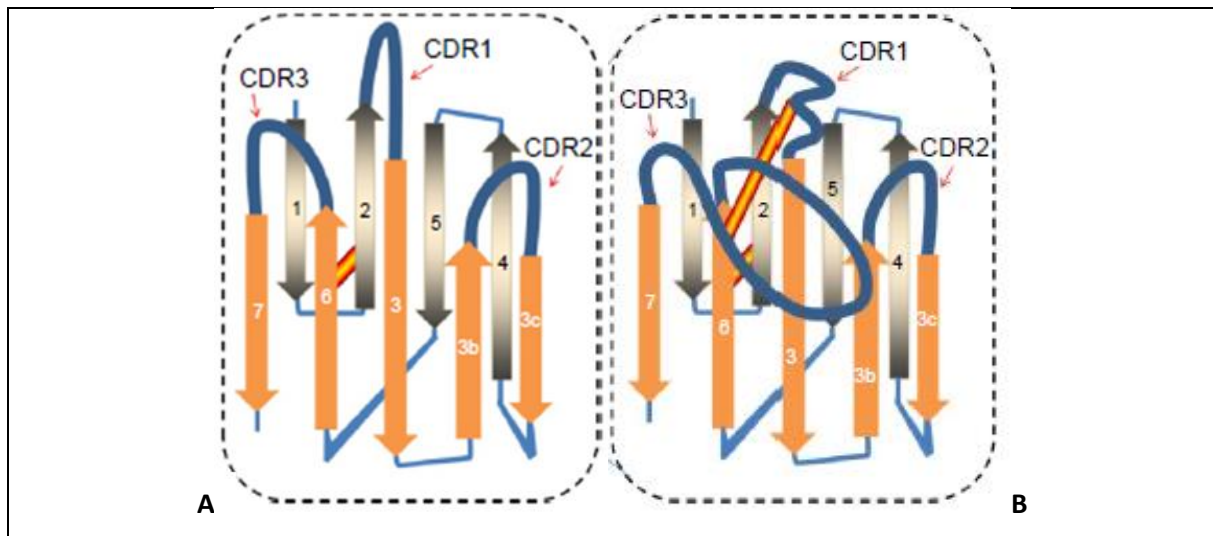


Figure 7 : Représentations schématiques des domaines variables de la chaîne lourde d'anticorps. (A) Domaine variable VH présent au sein d'immunoglobulines classiques ; (B) Domaine variable VHH retrouvé exclusivement chez les camélidés [1].

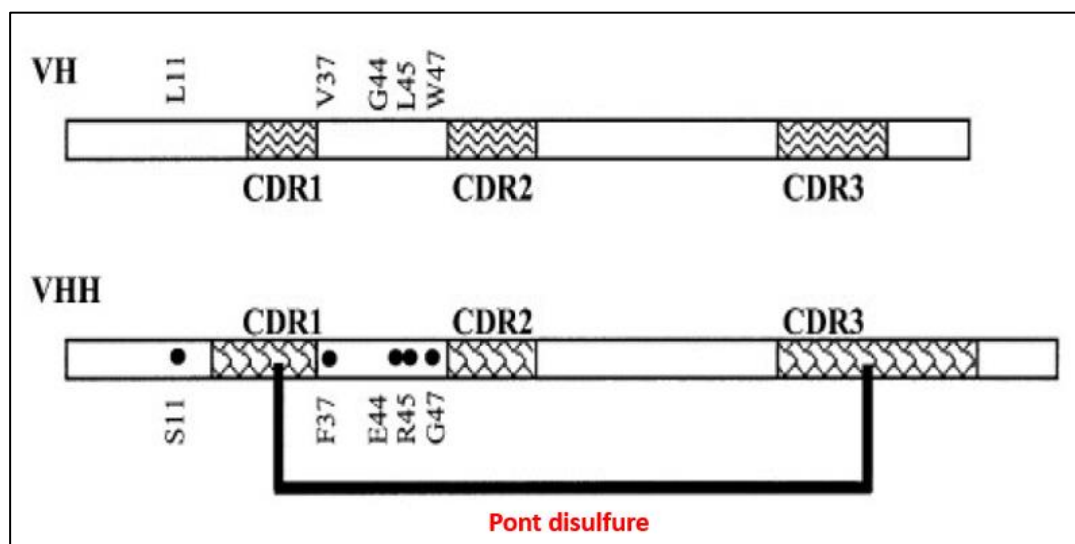


Figure 8 : Illustrations des domaines VH et VHH avec les 4 FRs, les 3 CDRs et les résidus hydrophobes des VHs (L11, V37, G44, L45 et W47), présents au sein des FRs, et substitués par des résidus hydrophiles et plus petits (S11, F37, E44, R45 et G47) au sein des VHHs. Un pont disulfure entre les CDRs 1 et 3 est également représenté par le crochet noir [8].

La famille des camélidés (chameau, lama et genre vicugna) fait partie du sous-ordre des Tylopoda. Les Tylopoda font parties de l'ordre des Artiodactyla, tout comme les Ruminantia (bovins, moutons) et les Suiformes (cochons, hippopotames). Comme mentionné ci-dessus, tous les vertébrés produisent des immunoglobulines conventionnelles, mais les camélidés ont la particularité de produire aussi un deuxième type d'anticorps que l'on appelle les HCAs. Malgré leur forte parenté phylogénétique, les Ruminantia et les Suiformes n'en produisent pas [5,6]. Les HCAs (90KDa) comprennent deux chaînes lourdes mais pas de chaînes légères (**Figure 6C**) et pas de domaines CH1 au niveau de leur chaîne lourde. En effet, le domaine CH1 est excisé hors de l'ARNm final par épissage alternatif. Ces anticorps ont la particularité de ne porter qu'un seul domaine variable, le domaine VHH, appelé aussi nanobody (**Figure 6D**) qui correspond au plus petit fragment d'anticorps (15KDa) monomérique capable de lier son antigène avec une affinité comparable à celle d'un anticorps conventionnel ou d'un F_{ab} sans nécessiter la formation d'un dimère [1].

1.2.2. Structure d'un nanobody

La structure générale d'un domaine variable VH (**Figure 7A**) comprend 9 brins bêta séparés par des boucles. Ce domaine VH est organisé en deux types de régions distinctes. Le premier type de régions nommées CDRs (*complementary-determining regions*) correspond à 3 boucles localisées du côté N-terminale du domaine et présentant une hypervariabilité de séquence (CDR-1,-2,-3). Ces boucles sont responsables de l'interaction avec l'antigène. Le deuxième type correspond à 4 régions du domaine VH dont la séquence est conservée et sont nommées *Framework* (FR-1,-2,-3,-4). Elles sont situées entre les boucles CDRs. Le VH porte également un pont disulfure entre la cystéine 23 du FR1 et la cystéine 94 du FR3 [1]. La structure du VHH (**Figure 7B**) présente une organisation très proche de celle du VH et reflète une forte identité de séquence entre ces deux domaines [6,7].

Malgré cette forte ressemblance, le VHH possède certaines propriétés qui le distinguent quelque peu du domaine VH et qui lui assurent ainsi des caractéristiques propres (**Figure 8**).

La première grande différence est la substitution de nombreux résidus hydrophobes présents dans le FR2 chez le VH (V37, G44, L45, W47) par des résidus plus hydrophiles et moins encombrants (F37, E44, R45, G47) chez le VHH [8]. Chez les VHs, ces résidus hydrophobes permettent d'interagir directement avec le domaine VL de la chaîne légère pour former un dimère VH-VL stable et actif.

Introduction

L'absence de chaîne légère chez les HCabs explique ces substitutions vers des résidus hydrophiles car ils augmentent la solubilité du domaine VHH et diminuent ainsi le risque de formation d'agrégats [1].

Une autre différence est la substitution de la leucine du domaine VH en position 11 par une sérine chez le VHH. La leucine établit des contacts hydrophobes avec une phénylalanine et une proline situées sur le domaine CH1. L'absence de domaine CH1 chez les HCabs explique la substitution de la leucine par une sérine plus hydrophile, pour augmenter la solubilité du domaine VHH [6].

Enfin, il faut également noter que les boucles CDR1 et CDR3 des domaines VHHs sont beaucoup plus grandes comparées à celles des VHs, ce qui permet de compenser la perte de surface de contact avec l'antigène fournie originellement par les 6 boucles CDRs du dimère VH-VL ($600-800 \text{ \AA}^2$) [1]. Cependant, la boucle CDR3 étant plus grande, elle est aussi plus flexible, ce qui est moins favorable d'un point de vue entropique pour une interaction efficace avec l'antigène. Ainsi, afin de stabiliser la boucle CDR3 et d'assurer une interaction efficace, un pont disulfure intracaténaire supplémentaire est également présent. Ce pont disulfure implique une cystéine du CDR3 et une cystéine du CDR1 ou du CDR2 respectivement chez les chameaux et les lamas [1,6]. La taille plus importante du CDR3 induit également une conformation plus convexe du paratope du VHH et permet donc une insertion plus simple dans des épitopes enfouis et moins accessibles tels les sites actifs d'enzymes. Les VHHs peuvent donc influencer son activité catalytique et/ou stabiliser une structure de l'enzyme dans le cadre d'expériences de cristallographie [1,5].

1.2.3. Caractéristiques physico-chimiques des nanobodies

La première caractéristique importante du nanobody est sa petite taille (133 AA). En effet, cette dernière mesure environ 2,5 nm de diamètre et 4 nm de long. De ce fait, il est capable de pénétrer plus facilement dans les tissus, notamment les tissus tumoraux, ainsi que d'atteindre des épitopes difficilement accessibles. Cette petite taille, associée à un grand nombre de résidus hydrophiles exposés au solvant, permet également d'accentuer sa solubilité et de diminuer la propension à l'agrégation [8].

L'interaction entre les nanobodies et leur cible se caractérise par des constantes cinétiques individuelles qui conduisent à la formation rapide d'un complexe (k_{on} comprises entre 10^5 et $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) et à une dissociation lente (k_{off} entre 10^{-4} et 10^{-2} s^{-1}). De ce fait, l'affinité du nanobody pour l'antigène est très forte et les valeurs de la constante d'équilibre de dissociation (K_D) sont souvent de l'ordre du nanomolaire, voire du picomolaire [5].

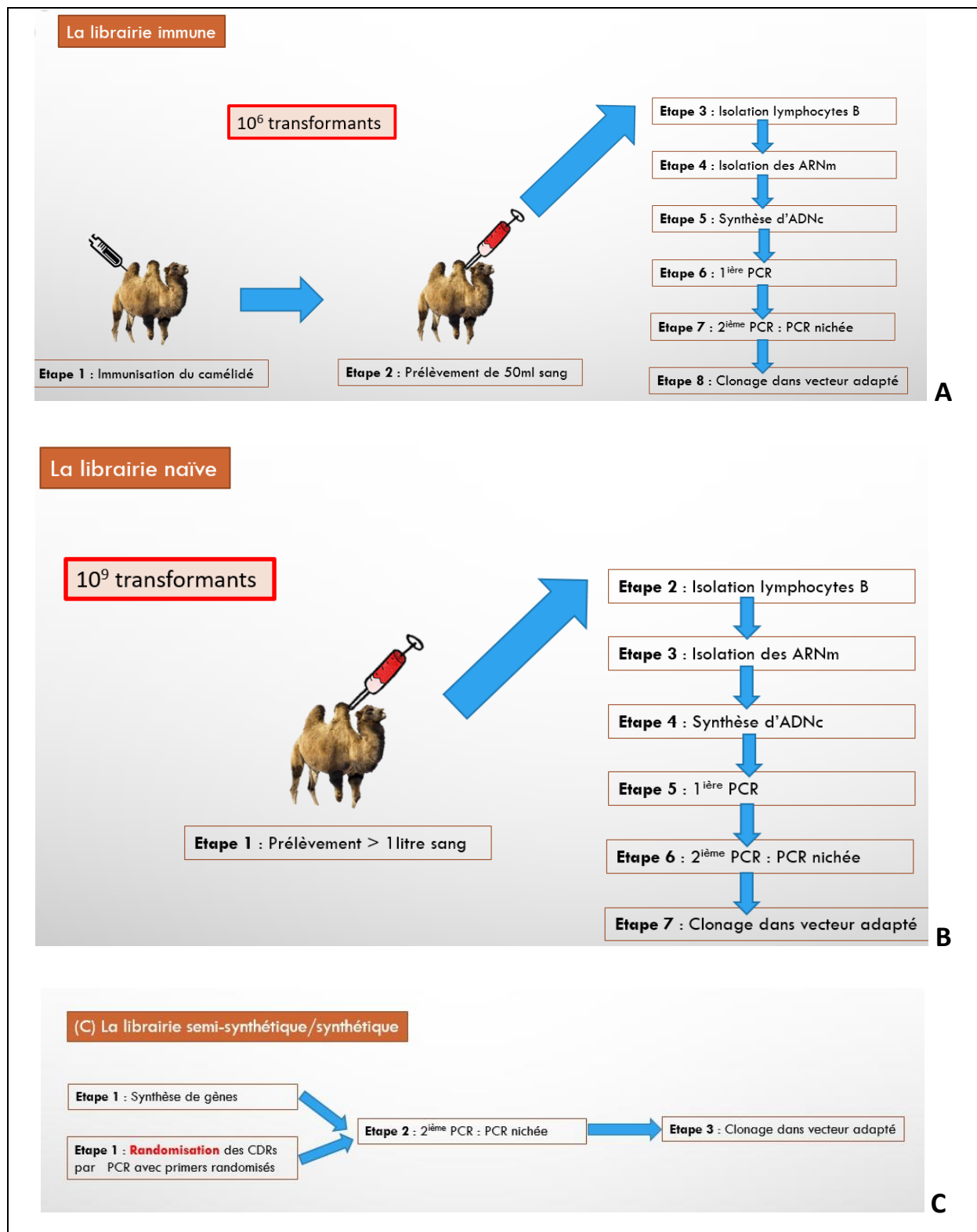


Figure 9 : Etapes appliquées dans le cadre de la réalisation d'une librairie d'anticorps. (A) Une librairie immune ; (B) Une librairie naïve ; (C) Une librairie synthétique

La production de ces nanobodies est également bien maîtrisée. En effet, de nombreux systèmes d'expression recombinante de ces derniers ont été établis et optimisés en bactéries, dans des champignons, dans des cellules de mammifères ou des cellules de plantes. Par exemple, une expression d'un nanobody dans *E.coli* est rapide, peu onéreuse et permet d'obtenir, en général, 1 à 10 mg de protéines par litre de culture [4,5].

Un grand avantage quant à l'utilisation des nanobodies est, en général, sa très grande solubilité et stabilité. En effet, ils peuvent être concentrés jusqu'à 10 mg/mL et être stockés pendant plusieurs mois à 4°C. Ils tolèrent des pH extrêmes, sont robustes à l'action des protéases et aux agents chaotropiques. De plus, ils ont également une grande stabilité thermique avec des valeurs de demi-dénaturation (T_m) comprises entre 60 et 80°C [5].

Les nanobodies sont en général non immunogènes lorsqu'ils sont injectés chez l'homme de par leur forte identité de séquence avec le domaine VH humain. De plus, leur petite taille leur assure une élimination rapide du sang, diminuant ainsi leur toxicité [3,5].

1.2.4. Méthodes d'ingénierie et de sélection de nanobodies

Depuis plusieurs décennies, la communauté scientifique tente de développer des anticorps contre un antigène particulier et ce, pour différents domaines d'application. Dans le cadre d'ingénierie de VHHs, la stratégie utilisée est bien établie et fait preuve d'une grande robustesse dans la majorité des cas.

Dans un premier temps, une librairie de nanobodies doit être réalisée afin de pouvoir sélectionner le(s) variant(s) de cette librairie qui se lie à l'antigène d'intérêt. La librairie la plus couramment utilisée est la librairie immune (**Figure 9A**) qui passe par une étape d'immunisation d'un camélidé avec l'antigène d'intérêt. Elle possède de nombreux avantages dont la maturation somatique, qui consiste en la sélection d'anticorps avec une forte affinité pour l'antigène directement chez le camélidé durant l'immunisation. Le sang de l'animal immunisé est alors collecté, les lymphocytes récoltés, et l'ADN extrait. Ensuite, une PCR est réalisée afin d'amplifier les gènes encodant les différents VHHs en utilisant des amorces spécifiques. Ce pool de gènes est alors sous-cloné dans un phagémide puis transformé en bactéries, afin de permettre la sélection du(es) variant(s) qui lient l'antigène cible par la méthode du *phage display*.

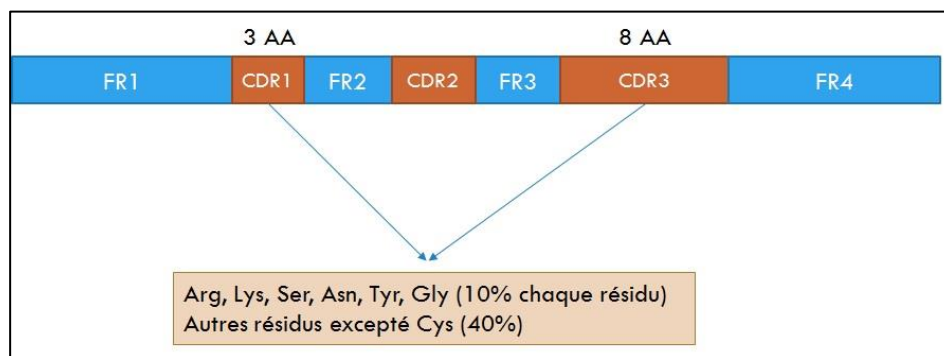


Figure 10 : Schéma illustrant un nanobody avec ses quatre régions FRs et ces trois régions CDRs. 11 résidus faisant parties des domaines CDR1 et CDR3 ont été mutés avec, pour chaque position, 10% en Arginine, 10% en Lysine, 10% en Serine, 10% en acide aspartique, 10% en glycine et 10% en tyrosine. Les 40% restant comprennent l'ensemble des autres acides aminés excepté la cystéine.

La diversité de ce type de librairie est de l'ordre de 10^6 variants individuels, ce qui correspond à l'ensemble du répertoire de VHH immuns présent dans le sang d'un animal immunisé [1]. Cependant, une immunisation n'est pas toujours possible si l'élément injecté est non immunogène ou toxique pour le camélidé. De ce cas, deux autres types de librairie existent également : la librairie naïve et la librairie synthétique [1,9]. La librairie naïve (**Figure 9B**) consiste en un prélèvement de sang de différents camélidés non immunisés. Néanmoins, étant donné l'absence de maturation somatique au niveau des lymphocytes, et donc l'enrichissement dans l'animal de VHH dirigé contre l'antigène, la diversité de ce type de librairie doit être très importante afin d'augmenter la probabilité d'isoler, parmi les variants de cette librairie, un VHH dirigé contre l'antigène d'intérêt. La taille de ce type de librairie doit atteindre au moins 10^9 variants individuels. [1,9]. Pour pallier le manque de diversité apporté par la librairie naïve, les scientifiques utilisent de plus en plus la librairie semi-synthétique ou synthétique (**Figure 9C**). Elle ne passe pas par une immunisation ou la récolte de lymphocytes de camélidés. Elle consiste à générer de manière synthétique (synthèse de gènes ou PCR avec amorces dégénérées) un pool de gènes encodant des variants VHHs. Les régions FRs de ces gènes sont conservées alors que les boucles CDRs, en particulier les boucles CDR1 et CDR3, sont mutées de manière aléatoire. Cette méthode requiert également une diversité importante afin d'augmenter la probabilité d'obtenir des variants ciblant l'antigène (au moins 10^9 variants). Cependant, elle reste beaucoup plus rapide puisque qu'aucune phase d'immunisation et de collecte de sang n'est nécessaire [9].

Préalablement à mon arrivée au laboratoire, une librairie synthétique a été réalisée par le Dr. Marylène Vandevenne fondée sur la technologie TRIM (*Trinucleotide Mutagenesis*). Cette méthode consiste à faire de la synthèse de gènes par assemblage de codons et non de nucléotides. Cette méthode permet ainsi de mieux contrôler la mutagenèse sans risquer l'introduction de codons STOP à un endroit non désiré [10]. Reposant sur l'expertise du Pr. Serge Muyldermans (Vrije Universiteit of Brussels) dans les interactions nanobodies/antigènes, la librairie a été synthétisée par mutagenèse aléatoire de 11 résidus : 3 résidus sur le CDR1 et 8 résidus sur le CDR3 (**Figure 10**). Cette mutagenèse a été réalisée en introduisant de manière préférentielle les 6 résidus les plus fréquemment retrouvés aux interfaces ARN-protéine des complexes répertoriés dans la PDB [11]. Pour chaque position mutée, cette mutagenèse incorpore 10 % d'arginine, 10 % de lysine, 10 % de serine, 10 % acide aspartique, 10 % de tyrosine, 10 % de glycine et les 40 % restant reprendront tous les autres acides aminés, à l'exception de la cystéine, pour éviter la formation d'un pont disulfure qui risquerait d'entraver la conformation du nanobody.

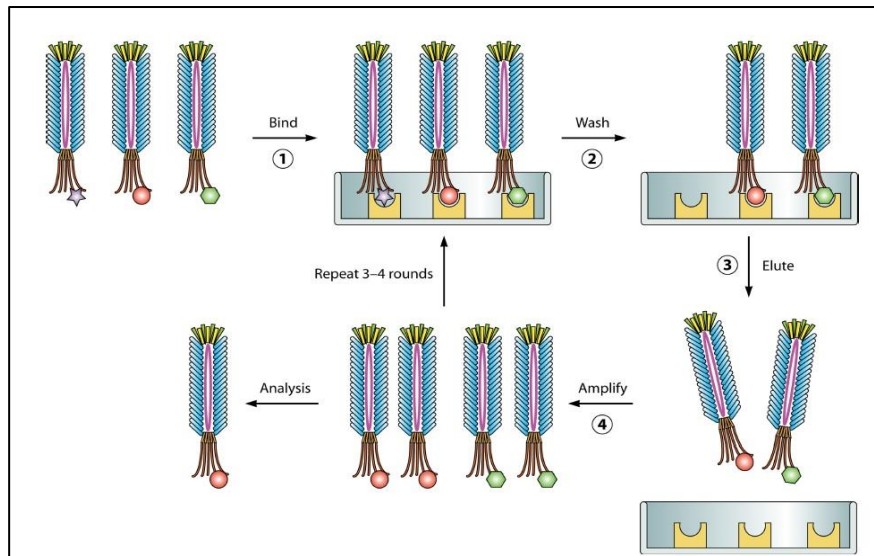


Figure 11 : Représentation du criblage d’une librairie de VHHs contre un antigène d’intérêt par *phage display*. Après avoir coexprimé les VHHs en fusion à la protéine d’enveloppe pIII du bactériophage M13, la sélection commence par la mise en contact des phages avec l’antigène immobilisé (1). Par la suite, une série de lavages est réalisée de manière à éliminer les phages attachés de manière non spécifique (2). Après avoir élué les phages ayant une forte affinité contre l’antigène (3), ces derniers sont amplifiés (4) de manière à pouvoir réaliser ce cycle 3 à 4 fois avant de procéder à l’analyse des variants sélectionnés [12].

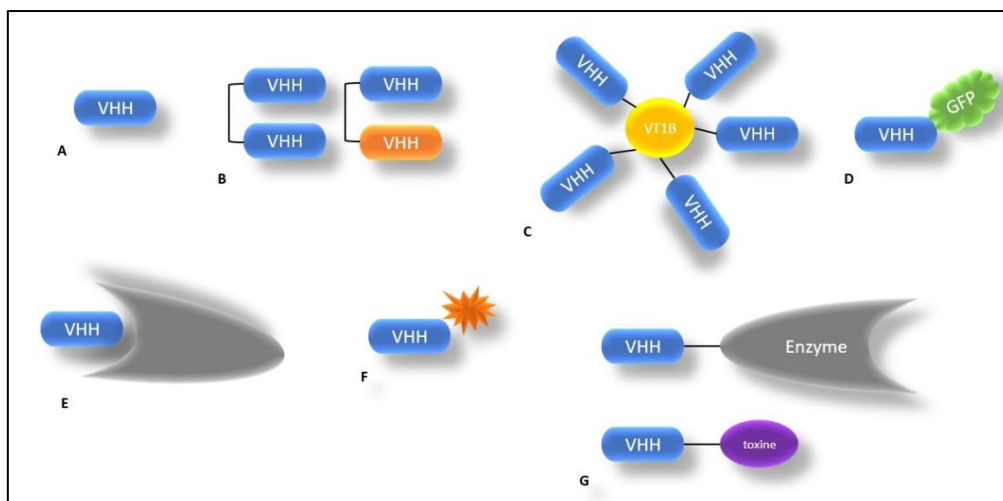


Figure 12 : Liste non exhaustive de différentes constructions basées sur les nanobodies. (A) nanobody employé seul ; (B) diabody bivalent (2 nanobodies identiques) ou bispécifique (2 nanobodies différents) ; (C) homopentamère de nanobodies associés à la protéine VT1B (bacterial verotoxin 1B) ; (D) chromobody (nanobody associé à une protéine fluorescente) ; (E) immunomodulateur ; (F) nanobody associé à un radionucléide ; (G) nanobody associé à une toxine ou à un domaine effecteur comme une enzyme.

Une fois la réalisation de la librairie terminée, la sélection de nanobodies dirigés spécifiquement contre l'antigène d'intérêt peut être réalisée par criblage. La méthode la plus couramment utilisée et la plus robuste est le *phage display* (**Figure 11**) [1]. Cette méthode consiste à coexprimer les VHHs de la librairie en fusion à une des protéines d'enveloppe du bactériophage M13, principalement la protéine pIII. Par la suite, le criblage peut être réalisé contre l'antigène d'intérêt afin de sélectionner les VHHs les plus affins [12].

1.2.5. Ingénierie des nanobodies et domaines d'application

De par leurs caractéristiques très intéressantes discutées au §1.2.3, les nanobodies sont utilisés dans de nombreux domaines comme la thérapie, le diagnostic ou encore dans le cadre de procédés de purification et d'immunoprécipitation [13]. Cependant, le nanobody est rarement utilisé seul et différentes constructions ont été développées comme des nanobodies bivalents ou bispécifiques (**Figure 12B**), correspondant à l'association par une séquence connectrice de deux nanobodies identiques ou différents, ainsi que des homopentamères correspondant à l'association de 5 nanobodies par utilisation d'une protéine bactérienne nommée VT1B (bacterial verotoxin 1B) (**Figure 12C**) [13]. Ils permettent ainsi d'augmenter l'avidité du système contre une cible. Enfin les nanobodies perturbant ou stabilisant la fonction catalytique d'une enzyme [5,14] sont appelés immunomodulateurs (**Figure 12E**).

Les nanobodies peuvent également être associés à différents domaines effecteurs tels qu'une enzyme ou une toxine (**Figure 12G**). De plus, de nombreux scientifiques utilisent également des chromobodies (**Figure 12D**), correspondant à l'association d'un nanobody et d'une protéine/molécule fluorescente, comme traceur dans le cadre de la localisation cellulaire [14]. Enfin, le nanobody, associé à un radionucléide (**Figure 12F**), peut être utilisé comme traceur dans le cadre de la visualisation d'une tumeur grâce notamment à sa forte affinité, sa spécificité à un antigène caractéristique de la tumeur et son faible pouvoir immunogène [14].

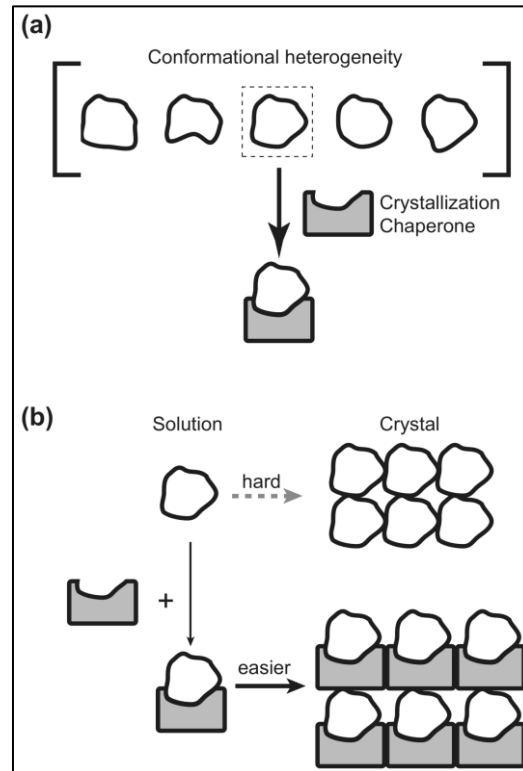


Figure 13 : Effets bénéfiques apportés par une protéine chaperonne dans le cadre de la co-cristallisation. Cette protéine permet de conserver une certaine homogénéité de la population (a). Elle intervient également dans le packing du cristal en augmentant considérablement les contacts cristallins (b) [15].

1.2.6. Co-cristallisation d'un ARN*st* assistée par un ou plusieurs nanobodies

Une autre grande fonction des nanobodies à laquelle nous nous sommes également intéressés pour ce travail concerne leur capacité à jouer le rôle de protéine chaperonne dans le cadre de la co-cristallisation [14]. En effet, dans ce projet, cette fonction est d'autant plus importante car la cristallisation d'un ARN structuré est particulièrement difficile. Ceci peut notamment se vérifier par le nombre de structures cristallographiques disponibles sur la PDB (Protein Data Bank). Effectivement, nous recensons 120438 structures protéiques au début du mois de mai 2017, alors que nous ne retrouvons que 3065 structures cristallographiques d'ARN, soit moins de 1 %. Ceci démontre la difficulté associée à la cristallisation d'un ARN.

Le premier problème à considérer dans le cadre de la cristallisation d'un ARN structuré, c'est sa très grande flexibilité. Il peut adopter différentes conformations, ce qui conduit à une population hétérogène [16]. L'utilisation d'anticorps comme protéine chaperonne permet de minimiser cette hétérogénéité en stabilisant l'ARN dans une conformation déterminée (**Figure 13A**) [15]. De plus, les ARNs possèdent une moins grande diversité chimique à leur surface que les protéines. En effet, les ARNs portent essentiellement des charges négatives dues aux groupements phosphates, créant ainsi des phénomènes de répulsion entre ces molécules et diminuant les contacts cristallins, essentiels dans le cadre de la cristallisation [16,17]. Les anticorps sont connus pour faciliter le packing du cristal (**Figure 13B**). En effet, en se liant à l'ARN, ils sont susceptibles d'augmenter les contacts cristallins en neutralisant une partie des charges négatives de l'ARN, mais également en réalisant des contacts cristallins entre eux [15,16]. Enfin, les techniques de phasage employées dans le cadre de la cristallisation de l'ARN sont particulièrement complexes. Grâce aux anticorps, il est généralement possible d'utiliser la méthode de remplacement moléculaire, leur structure étant connue, et d'ainsi pouvoir résoudre la structure de l'ARN plus facilement [15-17].

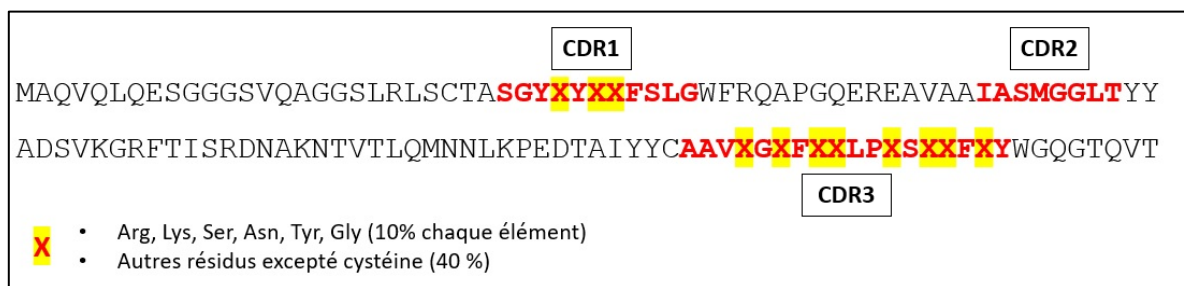


Figure 14 : Scaffold et CDRs randomisés du nanobody Cab-Bcl110. Les résidus en rouge correspondent aux différents CDRs tandis que les résidus représentés par la lettre X et surlignés de jaune correspondent à ceux randomisés lors de la formation de la librairie de nanobodies.

2. Objectifs du travail

Mon travail de fin d'étude s'insère dans un projet de recherche visant à développer des outils facilitant l'étude fonctionnelle et structurale d'ARN_{nc}. L'objectif général de ce projet est, dans un premier temps, de sélectionner des fragments d'anticorps de camélidés (nanobodies) capables de lier l'ARN avec une haute affinité et spécificité. Ensuite, ces nanobodies peuvent, d'une part, être utilisés afin de faciliter l'obtention de cristaux d'ARNs par co-cristallisation avec le(s) nanobodies et donc résoudre la structure tridimensionnelle d'un ARN de structure inconnue. D'autre part, ces nanobodies peuvent être utilisés dans des essais d'inhibition de l'activité catalytique d'ARNs structurés (ribozymes) afin de mettre en évidence des nanobodies neutralisants, comme démontré dans le cas de différentes enzymes.

La stratégie générale du projet de recherche auquel j'ai pris part est divisée en plusieurs étapes, à savoir la création d'une librairie de nanobodies optimisée pour la liaison avec l'ARN, suivie d'une sélection par *phage display* contre des ARNs structurés d'intérêt. Ensuite, les variants issus de cette sélection sont analysés pour leur propriété de liaison à l'ARN. Les nanobodies capables de lier l'ARN sont alors produits, purifiés et dès lors, leur interaction avec l'ARN est caractérisée par différentes méthodes. Enfin, les variants les plus affins et spécifiques sont utilisés dans des expériences de co-cristallisation ou d'inhibition de l'activité catalytique d'ARNs.

Préalablement à mon arrivée, Une librairie synthétique de nanobodies a été obtenue par mutagenèse aléatoire de 11 résidus présents au niveau des régions déterminant la complémentarité (CDRs). Cette mutagenèse a été réalisée de manière à incorporer préférentiellement les 6 résidus les plus couramment retrouvés aux interfaces de complexes protéine/ARN répertoriés dans la Protein Data Bank (**Figure 14**). Cette librairie de nanobodies a été exposée à la surface de bactériophages (M13) en fusion avec la protéine d'enveloppe pIII puis criblée contre un ARN cible, transcrit *in vitro*, qui consistait en un ARN fusion entre *BC1* (cfr § 1.1.4) et l'extrémité 5' de *rib_{glmS}* (cfr § 1.1.5) pour donner l'ARN fusion suivant : *^{5'}BC1-rib_{glmS}^{3'}*. Nous avons choisi de travailler sur cet ARN fusion pour plusieurs raisons : i) la présence de l'activité catalytique du ribozyme *glmS*, facilement mesurable, nous indique que les conditions expérimentales utilisées pour la production *in vitro* d'ARNs_{st} sont compatibles avec le repliement natif de ces derniers ; ii) il permet également de réaliser une seule expérience de criblage par *phage display* permettant d'obtenir des nanobodies dirigés contre *BC1* et *rib_{glmS}*. Les anticorps dirigés contre *BC1* nous permettraient de faciliter sa cristallisation et d'augmenter les chances d'obtention de sa structure tridimensionnelle, encore inconnue à ce jour. La sélection de nanobodies dirigés contre *rib_{glmS}* permettrait de démontrer, pour la première fois, la possibilité de moduler l'activité catalytique d'un ribozyme à l'aide de nanobodies.

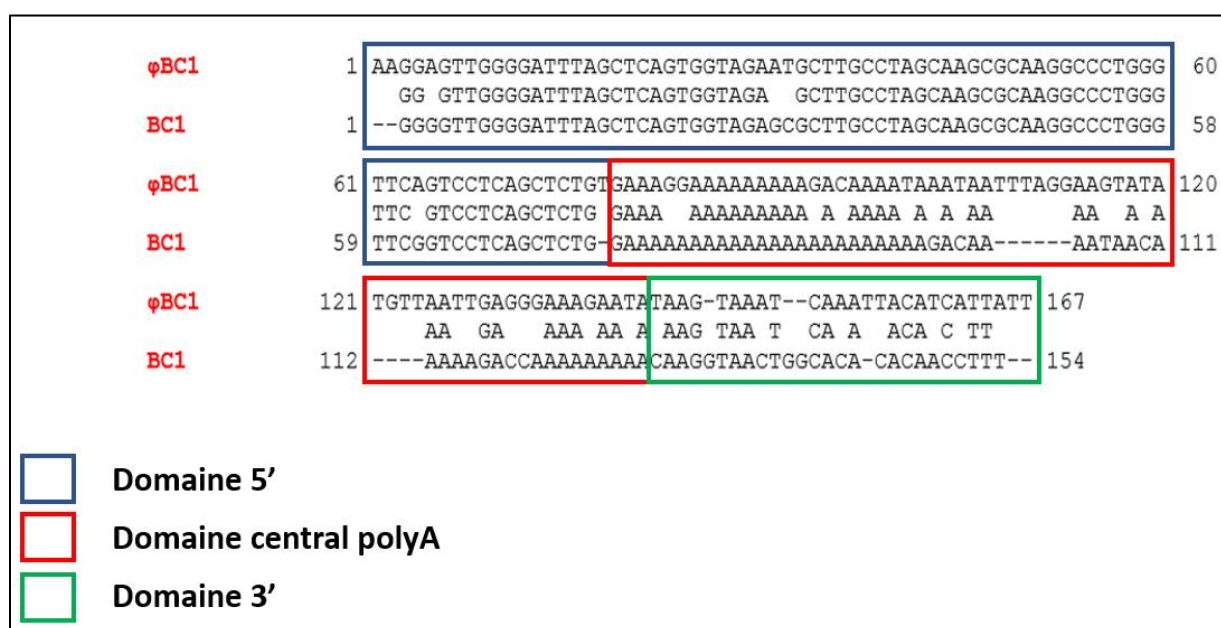


Figure 15 : Alignement des séquences BC1 et ϕ BC1. Leur pourcentage d'identité commune est de 72 % et comprend essentiellement le domaine 5' ainsi qu'une partie du domaine central polyA.

Objectifs du travail

Cinq cycles de sélection de la librairie de nanobodies ont donc été réalisés contre la fusion BC1-*rib_{gls}*. Des tests de type ELISAs (« *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays* »), réalisés avant le début de mon travail, ont permis de mettre en évidence 3 clones dirigés contre l'ARN fusion.

Il est aussi important de mentionner qu'une mauvaise annotation du génome nous a induits en erreur quant à la séquence nucléotidique utilisée pour produire par transcription BC1. Nous avons constaté que la séquence utilisée pour la sélection par *phage display* correspondait à celle d'un pseudogène de BC1 (ϕ BC1) (**Figure 15**). Ainsi, le biopanning n'a pas été réalisé sur la fusion BC1-*rib_{gls}* mais sur la fusion ϕ BC1-*rib_{gls}*. Nous avons, néanmoins, décidé d'analyser les clones issus du criblage par *phage display* afin de valider ou non l'approche expérimentale utilisée pour obtenir des nanobodies ciblant l'ARN_{st}.

Dans le cadre de mon mémoire, je me suis donc focalisé sur la caractérisation des clones issus de l'expérience de criblage contre ϕ BC1-*rib_{gls}*, ce qui implique la production et la purification de nanobodies et d'ARNs. Nous nous sommes également penchés sur la caractérisation de l'interaction entre ces nanobodies et ϕ BC1-Rib. Ainsi, mon mémoire est divisé en deux grandes parties avec, pour chacune d'entre elles, différents objectifs à atteindre.

Partie 1 : Production et purification des nanobodies et des ARNs d'intérêt :

- Production recombinante de nanobodies dans le périplasme d'*Escherichia coli* (*E.coli*)
- Purification de nanobodies à l'aide de différents protocoles selon le vecteur utilisé pour l'expression de ces derniers (chromatographie d'affinité, résine échangeuse d'ions).
- Production d'ARNs réalisée par transcription *in vitro* à partir d'un gène encodant l'ARN d'intérêt. L'ARN est ensuite purifié par tamis moléculaire.

Partie 2 : Caractérisation de l'interaction entre les nanobodies et les ARNs :

- Confirmation et caractérisation qualitative de l'interaction entre les 3 clones sélectionnés par *phage display* et ϕ BC1-*rib_{gls}* par interférométrie laser.
- Caractérisation de la spécificité des nanobodies pour ϕ BC1-*rib_{gls}* et identification du partenaire (ϕ BC1 ou *rib_{gls}*) de l'ARN fusion reconnu par les nanobodies, par interférométrie laser. Détermination des constantes cinétiques K_{on} , K_{off} et de la constante d'équilibre de dissociation (K_D) des nanobodies pour l'ARN cible, également par interférométrie laser.
- Étude du potentiel effet stabilisant des nanobodies vis-à-vis de la dénaturation thermique par (dichroïsme circulaire) et chimique (par traitement au diméthylsulfoxyde (DMSO)) de l'ARN.
- Étude de l'effet potentiel des nanobodies sur l'activité catalytique du ribozyme *gls*.



Figure 16 : Représentation schématique du vecteur pHEN4 utilisé lors de l'expérience de *phage display*. Ce vecteur inclut le gène codant la protéine de capsid pIII (*M13 gene III*-jaune) du phage M13, un gène de résistance à l'ampicilline (*ampR*-magenta), une origine de répllication du phage M13 (ori M13-gris), une origine de répllication chez *E.coli* (Rep pMB1-bleu clair), un promoteur *Lac* (Lac promoter-vert), un peptide signal (PelB-rose), un Tag HA (HA tag-bleu foncé) et un codon ambre (brun).

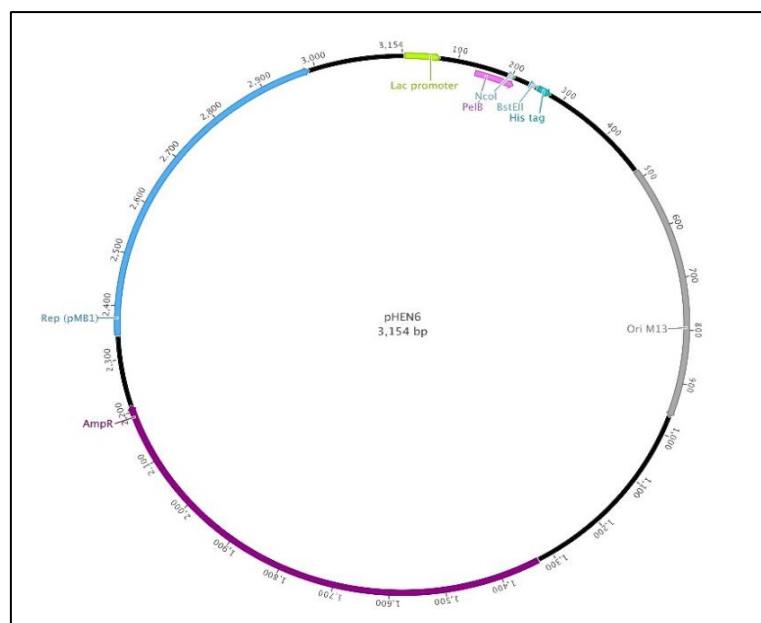


Figure 17 : Représentation schématique du vecteur pHEN6 utilisé pour l'expression recombinante de nanobodies dans *E.coli* . Nous retrouvons, au sein de ce vecteur, un gène de résistance à l'ampicilline (*ampR*- magenta), une origine de répllication au sein du phage M13 (ori M13-gris), une origine de répllication chez *E.coli* (Rep pMB1-bleu clair), un promoteur *Lac* (Lac promoter-vert), un peptide signal (PelB-rose) et un Tag poly-histidine (His_{x6}-turquoise).

3. Matériel et méthodes

3.1. Constructions génétiques

3.1.1. Les phagémides et vecteur d'expression pHEN : caractéristiques générales

Les vecteurs de type pHEN nous ont été fournis par le Prof. Serge Muyldermans de la VUB (Vrij Universiteit Brussel). Le pHEN4 est un phagémide et correspond au vecteur utilisé pour construire la librairie synthétique de nanobodies dans le cadre de la technique de *phage display*, technique qui avait été réalisée préalablement par le Dr Marylène Vandevenne en vue de la sélection de nanobodies contre différents ARNs_{st}. Le vecteur pHEN6 a été utilisé dans le cadre de ce mémoire pour l'expression recombinante de nanobodies par *E.coli*.

Les vecteurs pHEN4 (**Figure 16**) et pHEN6 (**Figure 17**) possèdent des propriétés communes, à savoir un gène de résistance à l'ampicilline (*ampR*), une origine de réplication du phage M13 (*ori M13*) permettant la réplication du phage M13 durant la sélection par *phage display*, une origine de réplication chez *E.coli* (pMB1), une séquence nucléotidique codant pour un peptide signal PelB et un site de clonage multiple (non représenté sur le schéma) situé en amont du peptide signal. La fusion de la séquence pelB et celle du gène codant pour la protéine mature d'intérêt permet l'expression de celle-ci dans le périplasme d'*E.coli* ce qui facilite la formation de ponts disulfures. On retrouve également un promoteur *Lac* qui assure l'expression de nos protéines suivant un système inductible à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (**annexe 1**) [28].

Les deux vecteurs montrent également certaines différences. En effet, le phagémide pHEN4 porte également un gène codant pour la protéine de capsid pIII du phage M13. Ce gène est situé en aval du site de clonage multiple dont la séparation est assurée par le codon STOP *Ambre*. Ce système permet donc l'expression de la protéine de capsid pIII du phage M13 en fusion à la protéine d'intérêt en vue d'une sélection contre un antigène par *phage display*, uniquement dans des cellules de types « *Suppresseur Ambre* » qui ne reconnaissent pas ce codon STOP et qui y incorporent un résidu Glu à la place. On retrouve également des Tag différents chez les deux phagémides puisque le vecteur pHEN4 possède un Tag HA correspondant à la séquence de l'épitope majeur de l'hémagglutinine du virus de la grippe (sa présence permet la détection des différentes protéines d'intérêt à l'aide d'anticorps anti-HA), alors que le vecteur pHEN6 possède un Tag His₆ permettant, notamment, une purification par affinité et une détection par anticorps anti-His.

3.1.2. Sous-clonages des séquences codant pour les nanobodies dans le vecteur pHEN6

La librairie de nanobodies, préalablement réalisée par le Dr. Marylène Vandevenne, résulte d'un clonage à large échelle d'un ensemble de gènes randomisés du nanobody dans le vecteur pHEN4. Afin de faciliter la purification de la protéine par utilisation d'une chromatographie d'affinité, un sous-clonage fut réalisé dans le vecteur pHEN6, ce-dernier possédant un Tag His₆.

3.1.2.1. Digestion du plasmide pHEN6

Une digestion du plasmide pHEN6 a été réalisée en mélangeant 6 µg de plasmides vides pHEN6, 5 µL de tampon Cutsmart 10X, 2 µL de d'enzymes *NcoI* HF (20000U/µL) et 2 µL d'enzymes *BstEII* HF (20000U/µL) dans un volume final de 50 µL. La digestion a été réalisée pendant 24 heures à 37°C. Le produit de digestion a été purifié en utilisant le kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel) en suivant les instructions du fabricant. Le produit de digestion a été élué dans 36 µL de tampon d'élution et analysé sur gel agarose 0,8 % afin de s'assurer une digestion complète du plasmide.

3.1.2.2. Digestion du plasmide pHEN4 contenant les gènes des nanobodies d'intérêts

Nous avons réalisé une digestion en deux étapes des vecteurs pHEN4-nb afin de récupérer les gènes encodant pour les nanobodies d'intérêt. Cette digestion séquentielle a été nécessaire car les conditions optimales d'activité des enzymes utilisées n'étaient pas compatibles. De ce fait, une première digestion a été réalisée à 37°C pendant 45 minutes. Entre 8 et 16 µg de plasmides pHEN4-nb ont été mélangés à 10 µL de tampon Fastdigest 10X et 1 µL d'enzymes de restriction *NcoI* (20000 U/µL) dans un volume final de 100 µL. Ces premières digestions furent purifiées en utilisant le kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel) et éluées dans 36 µL de tampon d'élution. Une seconde digestion de ces plasmides est alors réalisée en les incubant avec 10 µL de tampon Cutsmart 10X et 1 µL d'enzymes de restriction *BstEII* HF (20000 U/µL) dans un volume final de 100 µL. Après 1h30 d'incubation à 37°C, les produits de digestion ont été déposés sur gel agarose 2 % afin de séparer le plasmide pHEN4 (4550 pb) digéré des gènes encodant pour nos nanobodies d'intérêt (450 pb).

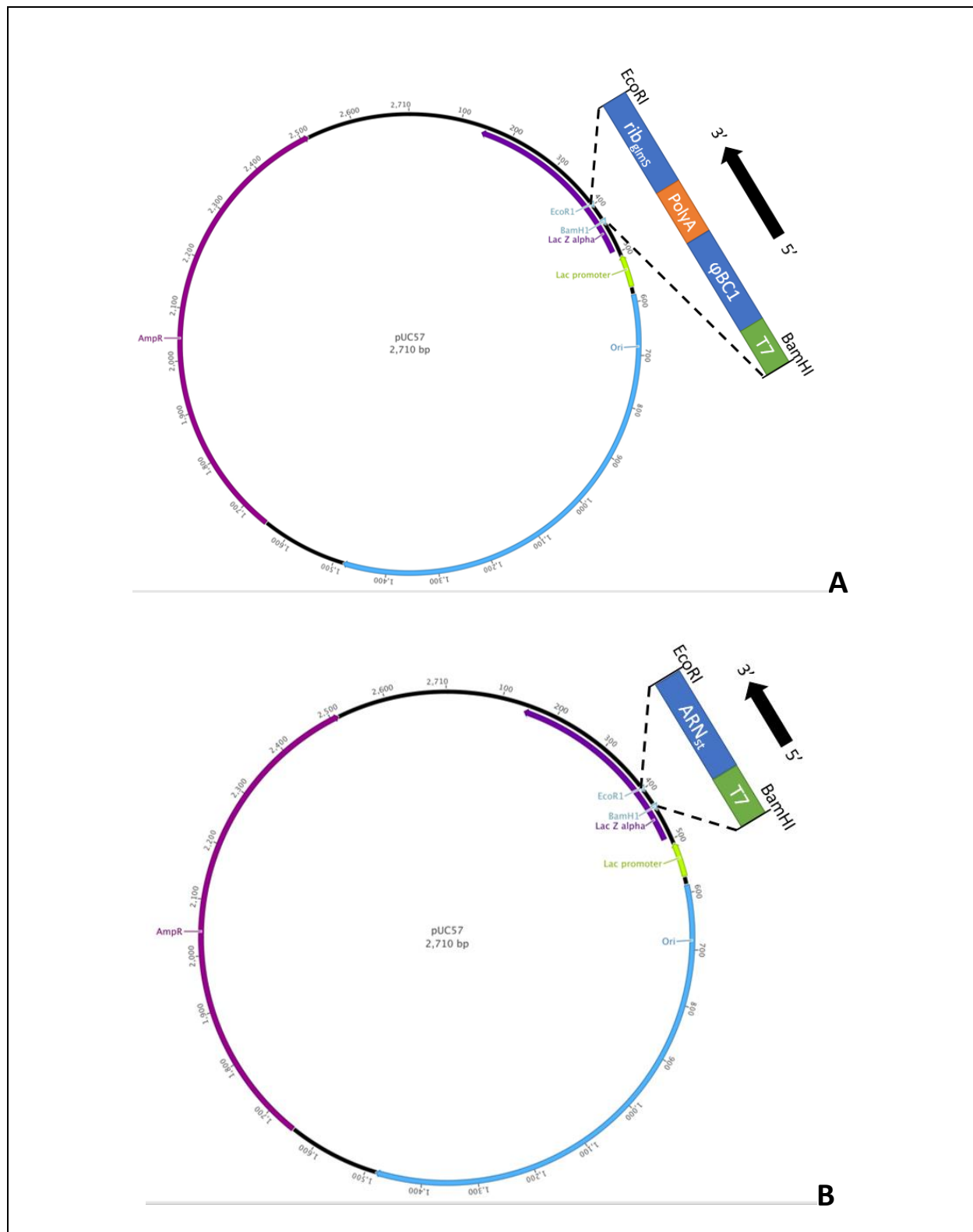


Figure 18 : Représentation schématique du vecteur pUC57 et de l'intégration du gène encodant soit l'ARN fusion (rib_{glns} et φBC1) (A) soit un ARN_{st} seul (B). Ces vecteurs ont été utilisés pour transcrire *in vitro* les ARNs correspondants. Le pUC57 contient un gène de résistance à l'ampicilline (*ampR*-magenta), une origine de répllication chez *E.coli* (ori-bleu clair), un gène codant pour l'enzyme LacZα (Lac Z alpha-violet) et un promoteur *Lac* (Lac promoter-vert). La flèche en noir indique le sens de la transcription (5' -> 3').

Les bandes correspondantes aux gènes encodant les nanobodies ont été découpées du gel, et l'ADN extrait fut purifié en utilisant le kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel).

3.1.2.3. Ligation des gènes codant les nanobodies dans le vecteur pHEN6

Une fois les digestions réalisées et purifiées, nous avons réalisé le sous-clonage des gènes codant pour les nanobodies dans le vecteur pHEN6 par ligation. Pour se faire, 4 µL de vecteurs pHEN6 digérés (150 µg/mL) ont été incubés avec 2 µL de tampon de ligation T4 (New England Biolabs) 10X, 2 µL de ligases T4 (400 U/µL), 8 µL d'inserts correspondant à nos nanobodies et 4 µL d'eau stérile pour atteindre un volume final de 20 µL. La ligation a été incubée ON à 18°C. Nous avons également réalisé un contrôle négatif comprenant exactement les mêmes réactifs mais en remplaçant les 8 µL d'inserts par 8 µL d'eau stérile. Les produits de ligation ont ensuite été transformés dans des cellules compétentes (*E.coli* DH5α) par choc thermique. Ces transformations ont été étalées et sélectionnées ON à 37°C sur boîte de pétri contenant du milieu LB et de l'ampicilline (100 µg/mL). Les clones résistants à l'ampicilline ont été analysés par digestion avec les enzymes de restriction *BstEII* et *NcoI* afin de vérifier la présence du gène encodant nos nanobodies. Les clones positifs à cette digestion ont été séquencés avant d'être utilisés pour l'expression recombinante des nanobodies dans *E.coli*.

3.1.3. Vecteur de type pUC57

Tous les gènes codant pour les ARNs_{st} sur lesquels nous avons travaillé ont été clonés dans un plasmide pUC57 par la firme Genecust. Ce vecteur contient un gène de résistance à l'ampicilline (ampR), une origine de répllication chez *E.coli* (oriC), un promoteur *Lac* et un gène codant pour une β-galactosidase. Son activité permet de réaliser des tests de criblage bleu/blanc afin de mettre en évidence l'insertion d'un fragment d'ADN.

Tous les gènes encodant nos ARNs_{st} d'intérêt ont été clonés entre un site de restriction *BamHI* au niveau de l'extrémité 5' et un site de restriction *EcoRI* à l'extrémité 3'. Dans le cadre de ce travail, nous avons principalement utilisé deux types de construction. D'une part, une construction qui code pour φBC1, précédé d'un promoteur T7 et fusionné à l'extrémité 5' du rib_{gImS}. Ces deux ARNs sont eux-mêmes séparés par une séquence polyA (A₁₅) afin d'apporter une certaine flexibilité entre les deux ARNs et prévenir d'éventuels encombrements stériques (**Figure 18A**).

D'autre part, nous avons également utilisé des ARNs_{st} seuls, non fusionnés au rib_{gms}, et précédés par un promoteur T7 (**Figure 18B**). L'ensemble des séquences sont présentées en **annexe 2**.

3.2. Production et purification des nanobodies

Dans le cadre de la production et de la purification des différents nanobodies, nous avons bénéficié de l'expertise du laboratoire du Prof. Serge Muyldermans [27]. Selon le vecteur utilisé (pHEN4 ou pHEN6), deux constructions de nanobodies différentes sont exprimées. Les nanobodies, produits à partir du vecteur pHEN4 dans des cellules *E.coli* (WK6) non-suppresseur du codon ambre, sont fusionnés à un tag HA et exportés dans le périplasma de la bactérie. Étant donné l'incapacité des cellules WK6 à supprimer des codons stop, il nous est possible, à partir du pHEN4, d'exprimer le nanobody seul, sans la fusion avec la protéine pIII du phage M13. De plus, cette souche est particulièrement efficace pour la production de nanobodies, efficacité qui nous a poussés à la conserver pour le vecteur pHEN6. Le pHEN6 permet, quant à lui, l'expression de nanobodies fusionnés à un tag poly-His₆ et également exportés dans l'espace périplasmique de la bactérie.

3.2.1. Expression recombinante des nanobodies à partir des vecteurs pHEN4 et pHEN6

Dans un premier temps, les vecteurs pHEN4 et pHEN6 encodant nos nanobodies d'intérêt sont transformés par choc thermique dans des cellules compétentes *E.coli* WK6 (F' lacIq delta(lacZ)M15 proA+B+ delta(lac-proAB) galE rpsL). Cette souche bactérienne est capable d'exprimer l'ARN polymérase T7 et reconnaît le codon STOP Ambre.

Des précultures sont réalisées à partir d'un repiquage de quelques colonies dans 100 mL de milieu LB supplémentées d'ampicilline (100 µg/mL). Ces précultures sont incubées ON à 37°C.

Les cultures sont réalisées dans un milieu TB (*Terrific Broth*), correspondant à un milieu riche, composé de 12 g de tryptone et 24 g d'extraits de levure pour 900 mL de milieu de culture. Nous utilisons également un tampon phosphate dont la composition est de 2,21 g de KH₂PO₄ et 16,43 g de K₂HPO₄.3H₂O pour 100 mL de tampon phosphate.

Matériel et méthodes

Nous réalisons des cultures dans des erlenmeyers d'un litre avec, dans chacun d'entre eux, 225 mL de milieu TB, 25 mL de tampon phosphate pH 7, 250 μ L d'ampicilline (100 mg/mL), 1 mL de glycérol 100 % et 5 mL de préculture réalisée préalablement.

Elles sont incubées à 37°C jusqu'à une absorbance à 600 nm comprise entre 1,5 et 2 ce qui correspond à la phase exponentielle de la bactérie. Par la suite, nous induisons l'expression de la protéine d'intérêt par ajout d'IPTG (concentration finale de 1 mM). Les cultures sont alors incubées ON à 28°C.

3.2.2. Purification des nanobodies exprimés à partir des vecteurs pHEN4 et pHEN6

3.2.2.1. Préparation d'extraits périplasmiques

Dans un premier temps, une centrifugation à 12400 g, pendant 30 minutes et à 4°C est réalisée afin de culotter les bactéries. Le surnageant est éliminé.

Ensuite, les culots sont resuspendus dans 200 mL de solution TES. Cette solution se compose de TRIS 0,2 M pH 8, d'éthylène diamine tétraacétique (EDTA) 0,5 mM et de sucrose 0,5 M. Le sucrose permet de déstabiliser la paroi bactérienne tout en conservant l'intégrité de la membrane cytoplasmique. Une fois la solution TES ajoutée, les cellules sont centrifugées à 24200 g pendant 20 minutes et à 4°C. Le surnageant est éliminé.

Enfin, les culots cellulaires sont resuspendus dans 150 mL d'une solution MgSO_4 5 mM, préalablement incubée à 4°C. Cette solution va induire la lyse de la paroi bactérienne et le relargage de nos protéines dans le contenu de cette extraction périplasmique par choc osmotique (phénomène de turgescence). Une pastille d'inhibiteurs de protéases (*cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail*) est ajoutée. Le tout est incubé 30 minutes sur glace et puis centrifugé pendant 30 minutes, à 33880 g et à 4°C. Le surnageant, correspondant à la fraction périplasmique, est conservé.

3.2.2.2. Lyse cellulaire

Nous nous sommes rendu compte que le protocole d'extraction périplasmique n'était pas très efficace et qu'une partie majoritaire de notre protéine soluble n'était pas libérée dans la fraction périplasmique. Nous avons donc décidé de réaliser des lyses cellulaires totales pour augmenter la quantité de protéines obtenues. Les lyses cellulaires n'ont été réalisées que pour les productions de nanobodies exprimés à partir du vecteur pHEN6. Après avoir centrifugé les cultures cellulaires de la même manière que les extractions périplasmiques (*cfr* § 3.2.2.1), les culots sont dans 200 mL d'HEPES 50 mM pH 7, NaCl 150 mM et MgCl₂ 5 mM. Le disrupteur *EmulsiFlex-C3* de la compagnie Avestin est utilisé afin de provoquer une rupture et une homogénéisation des cellules en les soumettant à une forte pression.

3.2.2.3. Purification par chromatographie d'affinité

Une fois l'extraction périplasmique ou la lyse cellulaire achevée, une étape de purification par chromatographie d'affinité est réalisée. Nous avons décidé d'utiliser une chromatographie d'affinité basée sur l'immobilisation d'un métal (IMAC) et plus particulièrement du type Ni-NTA (acide nitrilotriacétique). Cette méthode consiste en la chélation d'un ion Ni²⁺ sur un agent chélatant tétravalent, lui-même associé à une matrice, souvent de nature polysaccharidique. L'ion Ni²⁺ est ainsi capable d'interagir avec deux His d'un tag poly-His₆ associé à une protéine, permettant ainsi son immobilisation. L'élution de la protéine se fera au moyen d'un compétiteur tel que l'imidazole qui possède un hétérocycle aromatique fort semblable à celui de l'histidine [29].

Nous avons utilisé une colonne *HisTrapTM HP 5mL* de la compagnie Amersham Biosciences. Cette dernière est paquée avec une matrice « *Ni sepharose High Performance* » correspondant à des billes d'agarose sur lesquelles sont accrochés des agents chélatants capables d'immobiliser jusqu'à 15 µmol Ni²⁺/mL de milieu. Ce type de colonne permet d'immobiliser au maximum 40 mg de protéines portant un tag poly-His₆ et permet d'atteindre des pressions de maximum 4 MPa.

Tous les échantillons sont filtrés au préalable sur une membrane 0,22 µm et sont dilués dans une solution d'équilibration avant d'être chargé sur la colonne (200 ml d'échantillon) à du 2 mL/min. La colonne est préalablement équilibrée avec une solution d'équilibration (flux de 2 mL/min et 4 volumes de colonne) dont la composition correspond à du TRIS 50 mM pH 7, NaCl 150 mM, Imidazole 10 mM. L'imidazole permet d'éviter au plus des phénomènes d'interaction non spécifique avec la colonne.

Lorsque la totalité de l'échantillon a été chargée, nous avons réalisé une étape de lavage avec une solution constituée de TRIS 50 mM pH 7, NaCl 1 M, Imidazole 10 mM (2 mL/min). Cette étape permet de décrocher toutes les protéines qui se seraient fixées de manière non spécifique. Enfin, l'étape d'élution consiste en un gradient isocratique (flux de 1 mL/min) d'une solution d'élution permettant de varier la concentration en imidazole de 10 à 500 mM sur un volume total de 50 mL (10 volumes de colonne). Ce gradient est obtenu grâce au mélange entre la solution d'équilibration et la solution d'élution contenant du TRIS 50 mM pH 7, NaCl 150 mM et de l'imidazole 500 mM. Des fractions de 2 mL sont récoltées tout au long de ce gradient et l'absorbance à 280 nm est mesurée en continu. Les fractions présentant une absorbance importante à 280 nm sont alors analysées sur gel SDS-PAGE. Les fractions contenant notre nanobody (14,5 kDa) sont ensuite rassemblées et dialysées afin de mettre la protéine dans une solution de force ionique plus faible pour entamer une seconde étape de purification par chromatographie échangeuse d'ions. Cette solution se compose d'un tampon HEPES 20 mM pH 8 et de NaCl 20 mM.

3.2.2.4. Purification par chromatographie échangeuse de cations

Après analyse sur gel SDS_PAGE des échantillons issus de la chromatographie d'affinité, nous avons pu remarquer que ces derniers comportaient notre protéine ainsi que certains contaminants. Nous avons donc décidé d'augmenter la pureté de notre échantillon par une deuxième étape de purification correspondant à une chromatographie échangeuse de cations étant donné le point isoélectrique de notre protéine situé aux alentours de 9,6.

La chromatographie échangeuse de cations permet la séparation de résidus chargés positivement hors d'une solution. En effet, dans ce type de technique, nous retrouvons, en phase stationnaire, une résine porteuse de groupements chargés négativement et capables d'interagir avec un contre-ion positif. Lors de la charge de l'échantillon, les protéines de charge nette positive interagissent, par un phénomène de compétition, avec les charges négatives de la résine permettant ainsi leur immobilisation, tandis que les résidus négatifs subissent un phénomène de répulsion. Par la suite, les protéines chargées positivement seront éluées en utilisant des concentrations croissantes en NaCl, de sorte que les ions Na^{2+} rentrent en compétition pour la fixation sur la matrice [30,31].

Nous avons décidé d'utiliser une colonne *monoS 5/50GL* de la société GE Healthcare Life Sciences. Il s'agit d'une colonne d'un volume de 1 mL, de très haute résolution, qui est généralement utilisée pour finaliser une purification en enlevant notamment les dernières impuretés. La matrice est

formée de billes d'une taille de 10 μm portant des anions de type méthyl-sulfonate. Cette matrice est capable de supporter une pression maximale de 4 MPa [31].

Les échantillons sont filtrés au préalable et dilués dans une solution d'équilibration. Les différentes étapes sont similaires à celle de la chromatographie d'affinité. La colonne est équilibrée (flux de 1 mL/min) à l'aide d'une solution d'équilibration composée d'HEPES 20 mM pH 8, NaCl 20 mM. Dans ce cas-ci, après le chargement de l'échantillon, le lavage est réalisé avec la solution d'équilibration (flux de 1 mL/min), tandis que le tampon d'élution se compose d'HEPES 20 mM, NaCl 1 M. L'élution est réalisée à l'aide d'un gradient isocratique allant de 20 mM à 1 M de NaCl sur un volume de 20 mL (20 volumes de colonne). Des fractions de 1 ml sont récoltées tout au long de ce gradient et l'absorbance à 280 nm est mesurée. Les fractions qui présentent une A^{280} élevée sont alors analysées sur gel SDS-PAGE. Les fractions contenant notre nanobody (14,5 kDa) sont ensuite rassemblées et dialysées afin de conditionner la protéine dans un tampon HEPES 50 mM pH 7, NaCl 150 mM.

3.2.3. Vérification de l'intégrité de nos nanobodies purifiés

Nous avons appliqué quatre méthodes pour vérifier l'intégrité et la pureté de notre protéine : l'électrophorèse SDS-PAGE, la spectrophotométrie (spectres d'absorbance UV entre 240 et 340 nm), la spectrométrie de masse et une détection à l'aide d'anticorps anti-His par *Western Blot*.

Dans un premier temps, des gels SDS 4-20% *Mini-PROTEAN TGX™ Precast Protein Gels* de la compagnie Bio rad ont été utilisés pour la migration de nos échantillons dans une solution TGS (0,4 M glycine, 50 mM TRIS, SDS 0,01 %). L'échelle de poids moléculaire *Pierce™ Unstained Protein MW Marker* de la compagnie ThermoFisher SCIENTIFIC (**annexe 3**) a été utilisé pour permettre l'estimation de la taille de la protéine purifiée.

Les échantillons sont préparés par ajout d'une solution dénaturante 6X (TRIS HCl 40 mM pH 6,8, bleu de bromophénol 0,1 %, glycérol 35 %, SDS 3 % et β -mercaptoéthanol 0,06 %). Ils sont ensuite chauffés 5 à 10 minutes de manière à assurer la dénaturation des protéines et une migration, sur gel, uniquement en fonction de la taille de la protéine et non en fonction de sa forme ou de sa charge.

Une fois la migration réalisée, le gel est lavé trois fois avec de l'eau désionisée de manière à éliminer le SDS. Ensuite, une solution de colorant est ajoutée (*PageBlue Protein Staining Solution*) et placée au micro-onde pendant 30 secondes, pour accélérer la coloration du gel. Après environ une heure d'incubation dans la solution de coloration, le gel est placé dans de l'eau désionisée afin de le décolorer. La visualisation des gels SDS est réalisée à l'aide de *l'Image Quant Las 400*.

Les spectres UV sont enregistrés entre 240 et 340 nm. Ils sont réalisés grâce à un spectrophotomètre *PowerWave* de la société Bio-TEK instruments. Les échantillons sont placés dans une plaque UV-quartz de 96 puits, dont la capacité est de 170 µL/puit. Le blanc utilisé correspond au tampon dans lequel est conservée notre protéine.

La spectrométrie de masse a été réalisée par la plateforme GIGA-proteomics facility à l'aide d'un ESI-Q-ToF (Synapt G2, HDMS, Waters) en mode ion positif. L'échantillon a été analysé par ESI-Q-ToF-MS à une concentration en protéines de 10 µM. Cette dernière est conditionnée dans une solution dénaturante (acide formique 0,5 %, acétate d'ammonium 50 mM, Acétonitrile 30 %). Un aliquot de notre échantillon a été incubé en présence de DTT (2 mM) avant son injection dans le spectromètre afin de confirmer la présence d'un pont disulfure.

Nous avons également réalisé des *Western Blot* de manière à vérifier la présence de nos nanobodies dans les extraits périplasmiques. La révélation des nanobodies coexprimés avec un tag Hémagglutinine (HA) à partir du vecteur pHEN4 est réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal primaire de souris anti-HA, lui-même reconnu par un anticorps secondaire de chèvre couplé de manière covalente à une peroxydase qui reconnaît la partie constante de l'anticorps de souris. L'enzyme, en présence de son substrat, assurera la révélation de notre protéine par chimioluminescence [38]. Dans un premier temps, un gel SDS est réalisé suivant le protocole décrit ci-dessus. Ensuite, un transfert des protéines du gel est réalisé sur une membrane en PVDF (Polyvinylidène difluoride) préalablement incubée avec un tampon de transfert (TRIS 25 mM pH 8, glycine 192 mM, méthanol 20 %). Le transfert est effectué par application d'une différence de potentielle de 220 Volts pendant 30 minutes. Une fois le transfert réalisé, la membrane est lavée dans une solution de TBS (TRIS 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) à deux reprises durant 15 minutes avant d'être incubée dans une solution de blocage TBST (TBS, Tween 20 0,1 %, BSA 3 %) pendant toute la nuit à 4°C. Le lendemain, trois lavages avec du TBST sont réalisés, chacun pendant 15 minutes, avant de réaliser une incubation de la membrane, pendant une heure, par l'anticorps primaire anti-HA (1 mg/mL, dilution 1000 X dans du TBST, BSA 0,1 %) de la société abcam (ref : ab18181). Trois lavages de 15 minutes avec du TBST sont ensuite réalisés avant d'incuber la membrane, pendant une heure, avec un anticorps secondaire de chèvre anti-souris (1 mg/mL, dilution 500 X dans du TBST + 0,1 % BSA) de la société abcam (ref : ab6789). Une fois l'incubation terminée, un nouveau cycle de lavage (3 lavages au TBST) est réalisé. Enfin, le substrat de la peroxydase : le luminol (1 ml - *M western ECL*) et une solution de peroxyde d'oxygène (1 ml - *M western peroxyde solution*), de la société Biorad, sont incubés avec la membrane afin de révéler la présence de nos protéines par chimioluminescence à l'aide de l'*Image Quant Las 400*. Pour les WesternBlot, nous avons utilisé le poids moléculaire *Prestained Protein Ladder* de la compagnie Thermo Fisher Scientific (**Annexe 3**).

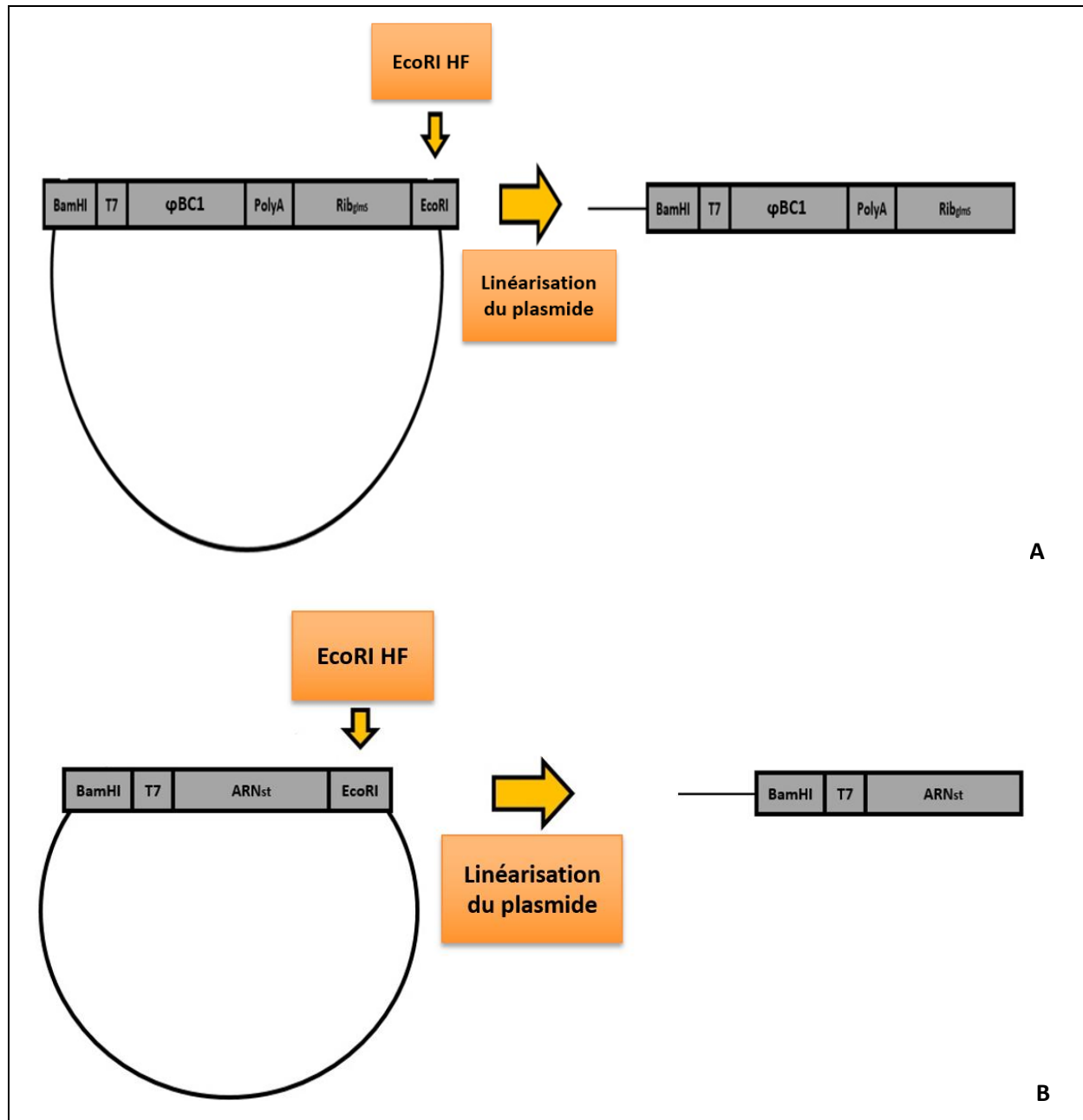


Figure 19 : Représentation schématique de la linéarisation du vecteur pUC57 contenant la fusion ϕ BC1-rib^{glnS} (A) ou un ARNst seul (B) par *EcoRI* HF en vue d'essais de transcription *in vitro*.

3.3. Production et purification des ARNs

Deux méthodes de transcription ont été utilisées dans le cadre de ce travail. L'une comme l'autre méthode a été choisie et utilisée en fonction de la quantité d'ARNs requise pour les expériences à réaliser.

3.3.1. Transcription *in vitro* à faible échelle

Pour les expériences ne nécessitant pas des quantités importantes d'ARNs, les transcriptions *in vitro* sont réalisées à l'aide du Kit *T7 Ribomax™ Express Large Scale RNA Production System* (Promega). Pour 40 µL de réaction de transcription, 2 µg de plasmides pUC57 linéarisés par *EcoRI* HF sont utilisés (**Figure 19**). Ce plasmide contient le gène de l'ARN à transcrire sous le contrôle du promoteur T7. Nous y ajoutons 20 µL du tampon *RiboMAX™ Express T7 2X Buffer*, 4 µL d'ARN polymérase du phage T7, 2 µL de RNase inhibiteur *Ribo Safe RNase inhibitor* (40 U/µL) et X µL d'eau RNase free pour atteindre un volume final de 40 µL. Les transcriptions sont incubées 2 heures à 37°C. Enfin, 2 µL de DNase (1U/µL) sont ajoutés et le mélange réactionnel est incubé 15 minutes à 37°C afin de dégrader le plasmide linéarisé.

3.3.2. Transcription *in vitro* à large échelle

Étant donné que certaines expériences nécessitaient davantage de matériel, nous avons utilisé un protocole qui permet de transcrire une quantité importante d'ARNs en limitant les coûts par rapport au Kit Promega décrit ci-dessus. Ce protocole se fonde sur les instructions d'utilisation de l'ARN polymérase du phage T7 commercialisée par la firme BIOKE. Dans ce protocole, 50 µg d'ADNs linéarisés pour 1 mL de transcription sont ajoutés à un tampon concentré 10 X (fourni par la firme), dont la composition correspond à du TRIS-HCl 40 mM pH 7,9, MgCl₂ 6 mM, spermidine 2 mM et DTT 1 mM. Cinq milles unités de polymérase T7 par mL de transcription sont ajoutés de même que les 4 NTPs à une concentration finale de 2 mM. Pour finir, nous utilisons également 200 unités de RNase inhibiteur *Ribo Safe RNase inhibitor* (40 U/µL) par mL de transcription et X µL d'eau stérile pour arriver au volume de transcription souhaité.

Les transcriptions sont incubées pendant 4 heures à 37°C et sont centrifugées toutes les heures à 20000 g pendant 5 minutes afin d'éliminer le précipité résultant de la formation de pyrophosphate qui est susceptible d'inhiber la transcription [32]. Après chaque centrifugation, du MgCl_2 (concentration finale 20 mM) est ajouté pour compenser la perte d'ions Mg^{2+} dans la réaction de précipitation de pyrophosphate. Une fois la transcription terminée, un traitement à la DNase I (*MO Bio DNase I*, 1U/ μL) pendant 30 minutes à 37°C est réalisé, en utilisant 1U de DNase par μg d'ADN linéarisé.

3.3.3. Purification des produits de transcription

La purification des transcrits produits à petite échelle à partir du Kit Promega est réalisée sur des tamis moléculaires adaptées à la purification de produits de transcription (75 μL de chargement maximal). Ces colonnes sont nommées *mini quick Spin Columns* et appartiennent à la compagnie Roche Life Science.

Les transcriptions à large échelle sont également purifiées à l'aide d'un tamis moléculaire qui permet la séparation des molécules suivant la taille de leur rayon de giration, les plus grosses molécules étant éluées plus rapidement que les plus petites molécules [33]. Cependant, l'ARN est une molécule beaucoup plus lâche qu'une protéine qui, en général, possède une structure plus compacte et donc plus globulaire. C'est pourquoi, il nous fallait choisir une colonne permettant la séparation de molécules de haut poids moléculaire afin d'avoir une résolution adaptée à la purification de notre ARN.

Pour se faire, nous avons utilisé une colonne de type *Sephacryl S-400 HR 24mL* de la compagnie GE Healthcare Lifes Sciences. Cette colonne, d'un volume de 24 mL, est essentiellement formée de Bisacrylamide et de dextran. Le diamètre des particules est d'environ 50 μm et la pression maximale supportée par la colonne est de 1,6 MPa. Elle permet la séparation de protéines globulaires de haut poids moléculaire (de 20 à 8000 KDa).

En pratique, la colonne est d'abord lavée à l'eau de manière à éliminer tout l'éthanol 20 % à un débit de 0,3 mL/min. Ensuite, elle est équilibrée (débit de 0,5 mL/min) avec une solution d'HEPES 50 mM, NaCl 150 mM et MgCl_2 5 mM. La boucle d'injection de l'échantillon, d'un volume de 500 μL , est, quant à elle, d'abord lavée avec du NaOH 1 M de manière à éliminer d'éventuelles RNases. Après ce traitement, cette boucle est rincée avec de l'eau, puis conditionnée avec la solution d'équilibration. Une fois toutes ces étapes réalisées, l'échantillon est injecté sur le tamis moléculaire et l'élution est réalisée à l'aide du tampon d'équilibration à une vitesse de 0,5 mL/min, sur 25mL de solution (**Chromatogramme typique en annexe 4**).

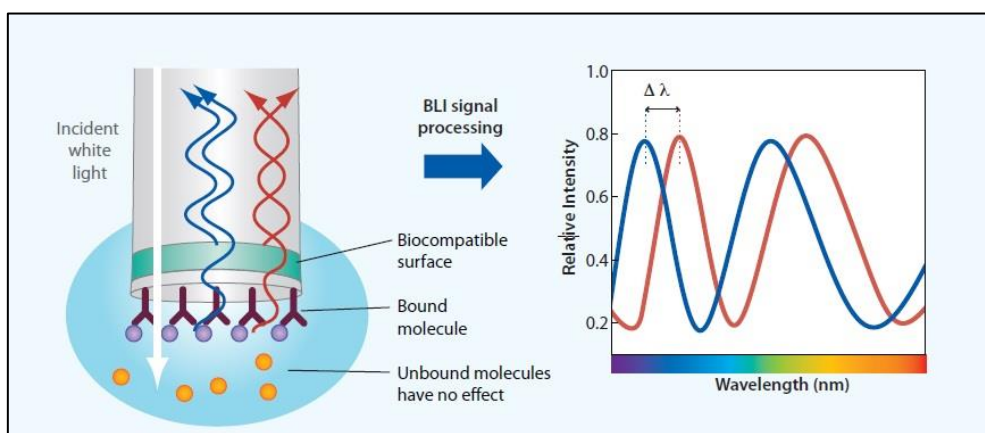


Figure 20 : Illustration du principe de mesure d'interaction par interférométrie laser. Cette méthode consiste en la mesure d'un profil d'interférence aux longueurs d'onde composant la lumière blanche entre deux surfaces exposées au bout d'un biosenseur. Par cette méthode, les paramètres cinétiques d'une interaction (k_{on} et k_{off}) sont calculés sur la base de la mesure d'un décalage de longueur d'onde entre des profils d'interférence différents résultant d'une interaction à la surface du biosenseur [34].

Des fractions de 1 mL sont récoltées. L'absorbance à 260 nm de l'éluat est mesurée en continu afin d'identifier les fractions contenant nos ARNs d'intérêt. Les fractions sont alors rassemblées et la concentration des ARNs purifiés est mesurée sur la base de l'absorbance de la solution à 260 nm à l'aide du spectrophotomètre *PowerWave* de la société Bio-TEK instruments (**Annexe 5**).

3.4. Tests d'interaction par interférométrie laser

3.4.1. Principe de l'interférométrie laser

Dans le cadre des études d'interaction entre les nanobodies sélectionnés et l'ARN, nous avons décidé d'utiliser la technologie d'interférométrie laser, à l'aide de l'instrument *Octet* (Pall ForteBio) (**Figure 20**). Cette technologie permet la mesure d'un pattern d'interférence aux différentes longueurs d'onde constituant la lumière blanche. En effet, une lumière blanche est envoyée sur le biosenseur et se retrouve à une double interface : la matrice biocompatible (référence interne dans le biosenseur) et la surface du biosenseur présentant des molécules immobilisées. La réflexion de la lumière sera différente au niveau de ces deux couches, créant ainsi un profil d'interférence pour chaque longueur d'onde qui compose la lumière, profil mesuré par un détecteur. L'interaction entre la molécule attachée au biosenseur et un analyte en solution provoque un épaissement de la couche biocompatible, résultant en une réflexion de la lumière différente et donc en un profil d'interférence qui est également différent. L'octet est capable de mesurer un décalage de longueur d'onde pour différents profils d'interférence et permet donc de déterminer différents paramètres cinétiques qui sont particulièrement intéressants dans des études d'interaction [34].

Toutes nos expériences d'interférométrie laser ont été réalisées avec une solution similaire au « *Kinetic Buffer* », une solution recommandée et fournie par les constructeurs pour les mesures d'interaction par ForteBio. Notre solution se compose d'HEPES 50 mM pH 7, de NaCl 150 mM, 80 U de RNase inhibiteur *Ribo Safe RNase inhibitor* (40 U/ μ L), de BSA 0,1 %, de Tween20 0,02 % et de NaN_3 0,5 %. La présence de BSA et de Tween permet de diminuer des interactions non spécifiques au sein de notre système. En fonctions des expériences réalisées, du MgCl_2 10 mM ou d'EDTA 10 mM sera ajouté.

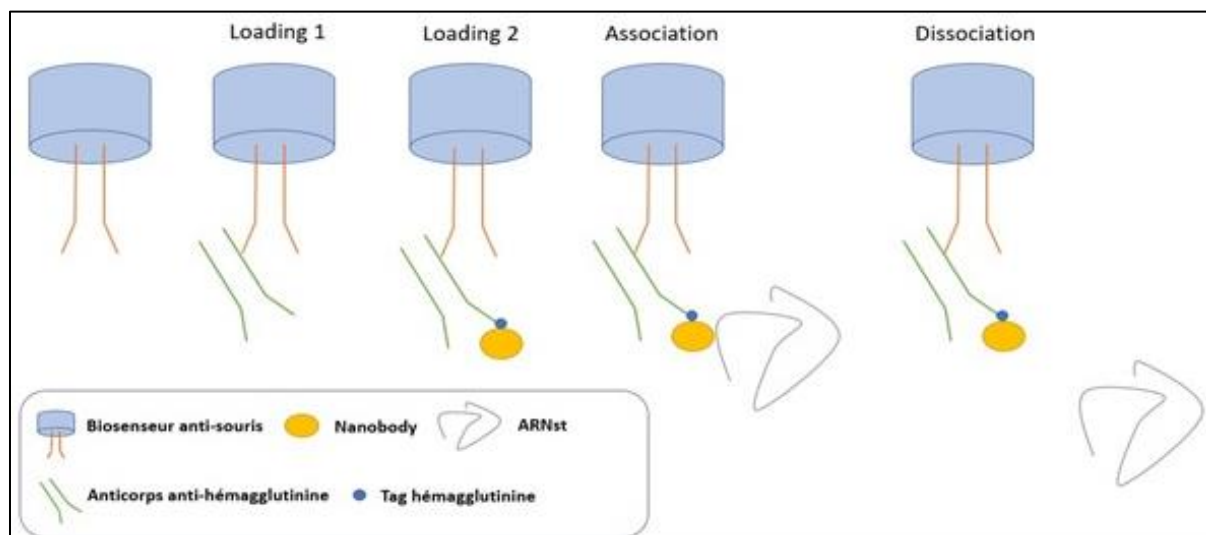


Figure 21 : Schéma illustrant le système expérimental utilisé dans le cadre des essais qualitatifs d'interaction, par interférométrie laser, des nanobodies exprimés à partir du vecteur pHEN4 avec l'ARN fusion ϕ BC1-rib_{gls}.

3.4.2. Mesure d'interaction des nanobodies exprimés à partir du pHEN4 avec ϕ BC1- rib_{gImS}

Ces essais ont été réalisés sur des extraits périsplasmiques contenant les nanobodies d'intérêts. Ces nanobodies ont été exprimés à partir du vecteur pHEN4 et sont donc fusionnés au tag hémagglutinine. Nous avons donc mis en place un système expérimental, assez innovant, faisant intervenir plusieurs couches biologiques (**Figure 21**). Dans un premier temps, un anticorps de souris anti-HA a été chargé et immobilisé sur un biosenseur coâté de manière covalente avec un anticorps anti-souris. Ensuite, nos extraits périsplasmiques ont été chargés sur le biosenseur et les nanobodies contenus dans ces extraits ont pu être immobilisés grâce à leur tag HA. Par la suite, nous appliquons l'ARN (analyte) afin de détecter une éventuelle association de notre analyte à la surface du biosenseur. Enfin, une solution de lavage est appliquée afin de suivre la dissociation du complexe formé. La constante cinétique d'association (k_{on}) est calculée sur la base de changements de patterns d'interférence mesurés durant la phase d'association, alors que la constante cinétique de dissociation (k_{off}) est calculée sur la base des changements de patterns d'interférence mesurés durant la phase de dissociation. Le rapport des deux (k_{off}/k_{on}) permet de déduire la constante d'équilibre de dissociation K_D .

L'anticorps anti-HA, utilisé dans le cadre de ces expériences, est un anticorps monoclonal de souris commercialisé par abcam (ref : ab18181) et dont la concentration stock est de 1 mg/mL. Nos expériences ont été réalisées en diluant 100 fois la solution stock d'anticorps. Les extraits périsplasmiques ont été dilués de 250 à 500X selon les échantillons. La concentration d'ARN utilisée est de 100 nM pour l'ARN_{st} ainsi que pour les différents contrôles (**Annexe 6**). L'association a été réalisée durant une période de 300 secondes tandis que la dissociation a été réalisée sur une période allant de 500 à 600 secondes. Enfin, un traitement à la glycine 10 mM pH 1,7 est réalisé afin de permettre la régénération des biosenseurs anti-souris en assurant le décrochage de l'anticorps anti-HA.

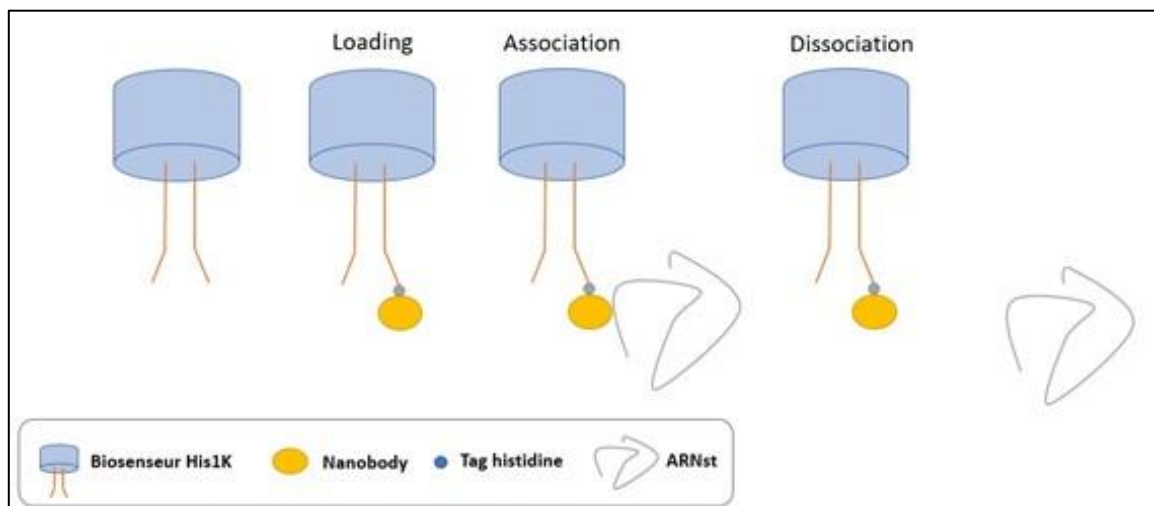


Figure 22 : Schéma illustrant le système expérimental mis en place pour caractériser l'interaction entre les nanobodies exprimés à partir du vecteur pHEN6 et ϕ BC1-rib_{gImS}.

3.4.3. Mesure d'interaction des nanobodies exprimés à partir du pHEN6 avec ϕ BC1- rib_{glmS}

La présence d'une queue poly-His, située à l'extrémité C-terminale de nos nanobodies exprimés à l'aide du vecteur pHEN6, a nécessité la mise place d'un système différent de celui présenté au §3.4.2. En effet, nous avons utilisé un biosenseur His1K qui est coaté de manière covalente à un anticorps anti-His murin et qui permet donc l'immobilisation directe de nos nanobodies (**Figure 22**). Les nanobodies purifiés sont chargés sur le senseur avec une concentration de 58 nM et pendant une période de 200 à 300 secondes. Pour les tests d'interaction qualitatifs, les différents ARNs_{st} ainsi que les contrôles (ARNss, ADNss, ADNds, BSA) dilués à une concentration de 100 nM sont chargés sur le senseur avec des mesures d'association et de dissociation durant 600 secondes (**Annexe 7**).

Des mesures quantitatives des paramètres cinétiques de l'interaction entre le nanobody B03 et l'ARN_{st} ϕ BC1- rib_{glmS} ou ϕ BC1 ont été réalisées en présence de MgCl_2 ou d'EDTA afin de quantifier l'affinité du nanobody pour les deux ARNs_{st}. Dans ces expériences, la protéine B03 a été chargée sur le biosenseur (anti-His : His1K) à une concentration de 58 nM pendant 120 secondes. Les associations ont été mesurées sur 60 secondes et les dissociations sur 600 secondes. Pour chaque expérience, 6 courbes d'interactions ont été mesurées en utilisant 6 concentrations décroissantes en analyte (ϕ BC1 rib_{glmS} ou ϕ BC1). Ces concentrations correspondent à des dilutions successives de 1,5 fois à partir des concentrations de 100 nM pour ϕ BC1 rib_{glmS} et de 500 nM pour ϕ BC1. Les valeurs de constantes cinétiques (k_{on} et k_{off}) ainsi que les valeurs de constantes d'équilibre de dissociation (K_D) ont été obtenues en ajustant les données expérimentales sur un modèle 1 : 1.

3.5. Étude de l'effet stabilisant des nanobodies vis-à-vis de la dénaturation thermique de ϕ BC1- rib_{glmS} par dichroïsme circulaire et par mesure d'activité catalytique du ribozyme glmS.

3.5.1. Étude de la stabilité thermique de ϕ BC1- rib_{glmS} par dichroïsme circulaire

3.5.1.1. Principe général du dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est une méthode couramment utilisée dans l'étude structurale des macromolécules biologiques car elle permet, en complément d'études telles que la RMN et la cristallographie, d'avoir un aperçu sur l'organisation structurale de notre macromolécule.

Le principe du dichroïsme circulaire repose sur le fait que la lumière plane polarisée est formée de deux composantes polarisées circulairement : une composante gauche tournant dans le sens inverse des aiguilles d'une montre et une composante droite tournant dans le sens des aiguilles d'une montre. Si un composé est optiquement actif (chiral), il sera capable d'absorber différemment pour ces deux composantes créant ainsi une différence d'angle de la lumière absorbée. Cette différence est mesurée par un spectropolarimètre et correspondant à un signal CD [35].

Les spectres CD sont beaucoup utilisés dans le cadre de la détermination de structures secondaires et tertiaires des protéines, respectivement, sur la base d'une caractérisation dans l'UV lointain et l'UV proche [35]. De plus, certaines études analysent également la(es) structure(s) des acides nucléiques, mais essentiellement leur contenu en structures secondaires, et principalement de l'ARN_{st}. En effet, le CD permet de mettre en évidence les formes A, B et Z de doubles hélices, de déterminer le contenu d'un ARN en *hairpin* ou en *duplex* d'ARN parallèles et antiparallèles [36].

3.5.1.2. Réalisation des spectres CD

Les spectres CD ont été réalisés à partir du spectropolarimètre CD *Jasco 810*. Nous avons décidé d'utiliser une concentration en ARNs de 500 nM et une concentration en protéines de 13,6 µM. L'étude des complexes ARN/nanobody comprend 3 rapports stœchiométriques : une stœchiométrie 1 : 1 correspondant à une concentration en ARNs et en protéines de 500 nM, une stœchiométrie 2 : 1 correspondant à une concentration en ARNs de 500 nM et de 1 µM en protéines, et une stœchiométrie 3 : 1 correspondant à une concentration de 500 nM en ARNs et de 1,5 µM en protéines. Les échantillons sont placés dans des cuvettes en quartz d'un trajet optique de 1 mm (*Hellma analytics, quartz Sprasil*). Les spectres sont réalisés sur une gamme de longueur d'onde de 200 à 360 nm, à une vitesse de 50 nm/min et à une température de 25°C. Les signaux mesurés correspondent à une moyenne évaluée sur 4 secondes et 3 accumulations. La solution tampon utilisée dans le cadre de ces expériences se compose d'HEPES 50 mM pH 7, NaCl 150 mM et MgCl₂ 10 mM. Un blanc a été réalisé par mesure d'un spectre du tampon seul. Ce dernier a été soustrait des spectres mesurés pour les différents échantillons.

3.5.1.3. Réalisation des courbes de dénaturation et de renaturation

Les courbes de dénaturation et de renaturation ont été réalisées dans une gamme de température allant de 25°C à 92°C, à une vitesse de 1°C par minute. Le signal CD a été mesuré à 267 nm pour l'ARN ϕ BC1-rib_{gls} (500 nM) seul ainsi que pour les complexes ARN/nanobody aux différentes stœchiométries testées (1 : 1, 1 : 2, 1 : 3). Les courbes de dénaturation/renaturation du nanobody seul (13,6 μ M) ont, quant à elles, été réalisées par mesure du signal CD à 223 nm. Les valeurs de signal CD présentées pour chaque température correspondent à des moyennes de mesures effectuées pendant 4 secondes pour chacune de ces températures. La cuvette ainsi que le tampon utilisé dans le cadre de ces expériences sont identiques à ceux utilisés pour la réalisation des différents spectres CD. Les T_m apparents ont été déterminés à partir d'un modèle sigmoïdal faisant intervenir le coefficient de Hill, coefficient qui tient compte de l'inclinaison des pentes lors du fit de la courbe.

3.5.2. Étude de la stabilité thermique de ϕ BC1-rib_{gls} par mesure de l'activité catalytique du ribozyme gls

Des solutions contenant l'ARN fusion ϕ BC1-rib_{gls} (3 μ M) seul ou en présence de nanobodies dans différents rapports stœchiométriques (1 : 1, 1 : 2 et 1 : 3) sont chauffés de 25°C à 92°C dans un bloc PCR à une vitesse de 0,1°C/s, puis refroidis à la même vitesse jusqu'à 25°C. Ensuite, le substrat de la réaction : le glucosamine-6-phosphate (GlcN6P) est ajouté à l'ensemble des échantillons à une concentration finale de 0,6 mM afin d'induire le clivage de l'ARN fusion ϕ BC1-rib_{gls} (336 nt) en ses deux ARNs_{st} constitutifs : ϕ BC1 (169 nt) et rib_{gls} (167 nt). 40U de RNase inhibiteur *Ribo Safe RNase inhibitor* (40 U/ μ L) sont également rajoutés à l'ensemble des échantillons. Un volume X de tampon composé d'HEPES 50 mM pH 7, NaCl 150 mM et MgCl₂ 10 mM est rajouté dans chacun des échantillons pour arriver à un volume final de 15 μ L (**Annexe 8**). Les échantillons sont incubés 30 minutes à 37°C. La réaction est ensuite stoppée par ajout de 60 μ L de DMSO (diméthylsulfoxyde) et 5 μ L de bleu de chargement (6X orange DNA loading dye) sont également ajoutés. Ces derniers sont incubés 1 heure à température ambiante avant d'être analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. À la concentration utilisée, le DMSO détruit l'ensemble des structures secondaires et tertiaires de l'ARN en empêchant l'appariement de type *Watson-Crick* entre les bases complémentaires, ce qui permet de linéariser l'ARN. Ainsi, la migration sur gel des échantillons est uniquement fonction de leur taille et permet donc de mieux différencier l'ARN fusion de l'ARN clivé.

La migration des différents échantillons (volume pour chaque échantillon de 35 µL) est réalisée sur un gel agarose 2 % dans lequel un agent intercalant (*Midori Green DNA Stain*) est ajouté préalablement. La solution utilisée pour le coulage du gel ainsi que pour l'électrophorèse correspond à une solution TEA (Tris-acétate 40 mM pH 8, EDTA 1 mM). Nous avons utilisé le marqueur de poids moléculaire *O'Gene Ruler DNA Ladder 50pB* (1 µg/mL) afin de vérifier le positionnement des différentes bandes sur nos gels (**Annexe 3**). Les gels ont été visualisés en utilisant le *VisiDoc-it Imaging System* de la société UVP.

3.6. Étude de l'effet stabilisant des nanobodies vis-à-vis de la dénaturation chimique de ϕ BC1-rib_{gims} par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de DMSO.

Ces expériences ont été réalisées en incubant l'ARN fusion ϕ BC1-rib_{gims} (3 µM) seul ou complexé au nanobody dans différents rapports stœchiométriques (1 : 1, 1 : 2 et 1 : 3) pendant 30 minutes à 37°C. Un volume X de tampon composé d'HEPES 50 mM pH 7, NaCl 150 mM et MgCl₂ 10 mM est rajouté dans chacun des échantillons pour arriver à un volume final de 15 µL. Au terme de l'incubation, 60 µL de DMSO sont additionnés aux différents échantillons et ces solutions sont incubées pendant 1h à température ambiante. 5 µL de bleu de chargement (*6X orange DNA loading dye*) sont ensuite rajoutés aux échantillons avant de procéder à leur analyse par électrophorèse sur gel agarose 2 % afin de mettre en évidence une déstructuration de l'ARN (bande linéaire) ou l'absence de déstructuration (bande diffuse - « *smear* »). Nous avons utilisé le marqueur de poids moléculaire *O'Gene Ruler DNA Ladder 1kb* (1 µg/mL) de manière à vérifier le positionnement des différentes bandes sur nos gels (**Annexe 3**). L'électrophorèse, ainsi que la visualisation des échantillons, est réalisée de manière identique au protocole décrit dans le paragraphe ci-dessus (*cfr* § 3.5.2).

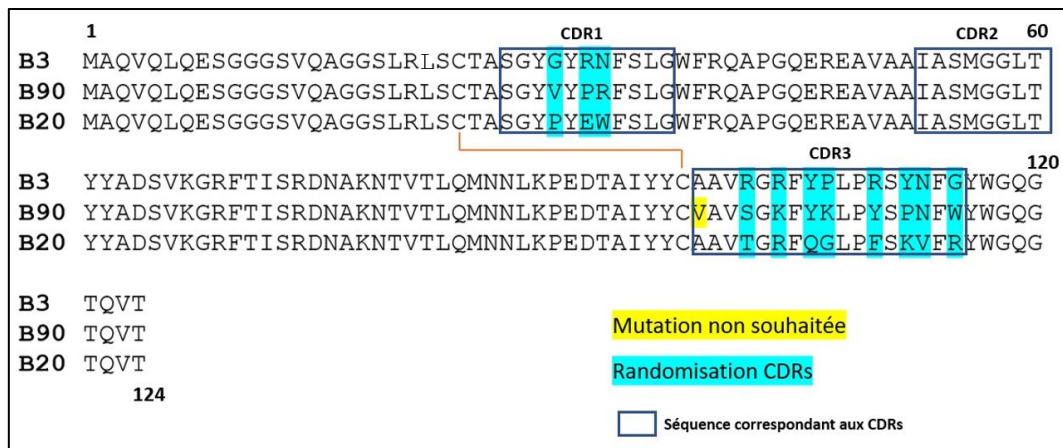


Figure 23 : Alignement des séquences en acides aminés des clones B03, B20 et B90, sélectionnés par *phage display* pour leur interaction avec ϕ BC1-rib_{glms} dans le vecteur pHEN4. Les résidus surlignés en bleu sont impliqués dans la randomisation des CDRs, tandis que les résidus surlignés en jaune correspondent à des mutations non souhaitées. La ligne orange correspond au pont disulfure établi entre la cystéine en position 24 et la cystéine en position 96. Les cadres bleus représentent les différents CDRs.

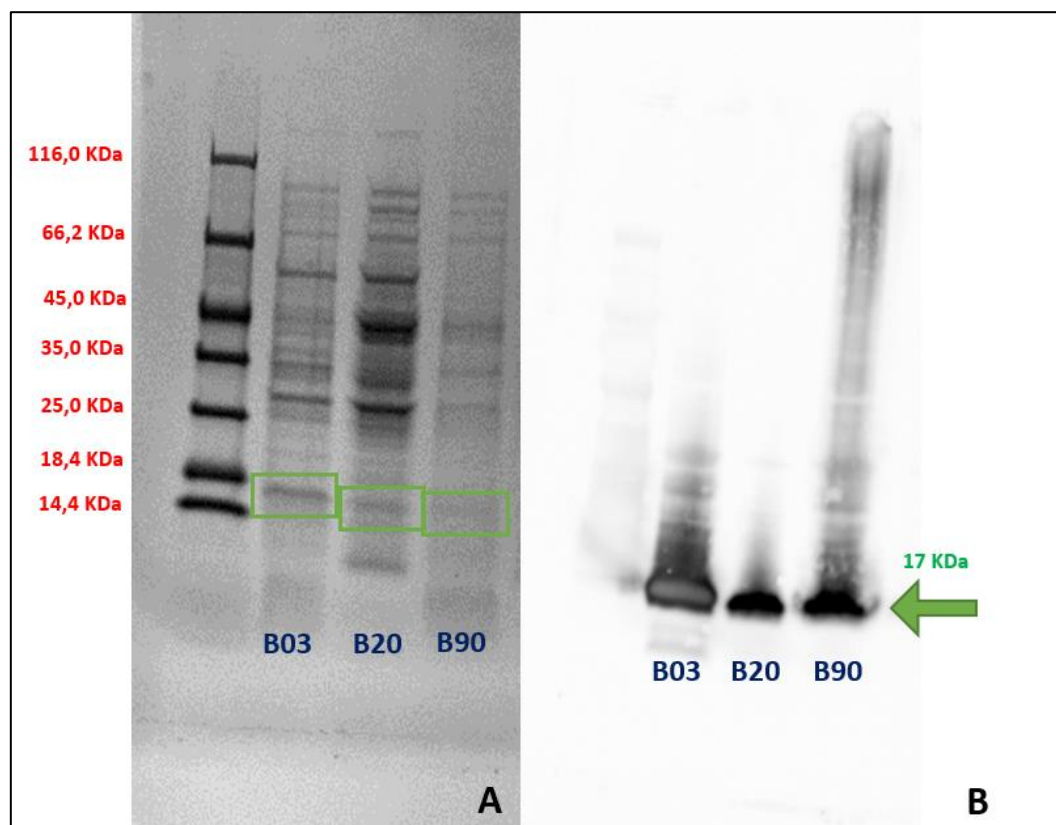


Figure 24 : Gel SDS analysé par coloration au bleu de coomassie (A) et par Western Blot (à l'aide d'anticorps anti-HA) (B) qui représentent les extraits périplasmiques obtenus à partir de cultures bactériennes exprimant les nanobodies B03, B20 et B90 à partir du vecteur pHEN4. Les encadrés et la flèche en vert mettent en évidence une bande à 17 KDa correspondant à notre nanobody fusionné à un tag Hémagglutinine.

4. Résultats et discussions

4.1. Production et purification des nanobodies sélectionnés par *phage display* à partir du vecteur pHEN4

Comme mentionné précédemment (*cfr partie objectifs*), trois nanobodies, nommés B03, B20 et B90, issus du criblage de la librairie synthétique de nanobodies par *phage display*, ont montré une interaction avec l'ARN fusion ϕ BC1-rib_{gImS} par ELISAs. Il importe de mentionner que le séquençage de ces 3 clones a révélé la présence d'une mutation dans la séquence du clone B90 au niveau des résidus non-randomisés dans la librairie initiale (**Figure 23**). Cette mutation, probablement introduite de manière fortuite lors de la synthèse de la librairie par la compagnie GeneArt, ou lors de l'amplification de cette dernière par PCR, n'a pas été corrigée. Nous avons décidé de conserver cette séquence telle quelle, sans modification par rapport à celle issue de la sélection, étant donné que cette mutation pouvait potentiellement influencer l'activité d'interaction avec l'ARN [42].

Dans un premier temps, nous avons voulu confirmer l'interaction entre ces nanobodies et l'ARN fusion observée par ELISA par le biais d'une autre méthode, l'interférométrie laser (BLI). Nous avons réalisé des extractions périsplasmiques de cultures bactériennes exprimant ces trois nanobodies à partir du vecteur pHEN4. Comme mentionné dans la section matériels et méthodes (*cfr § 3.1.1*), ce vecteur permet l'exportation de nos nanobodies dans le périplasme d'*E.coli*, permettant ainsi la formation des ponts disulfures nécessaires à leur stabilité. Ce vecteur comprend aussi un tag hémagglutinine (HA) à l'extrémité 3' (C-terminale) de la séquence de nos nanobodies ainsi qu'un codon ambre qui sépare l'extrémité 3' du tag HA et un gène codant pour la protéine d'enveloppe (pIII) du phage M13. L'expression de nos nanobodies, dans des cellules non-suppresseur, conduit donc à l'expression de nos nanobodies fusionnés au tag HA (poids moléculaire proche de 17 kDa), sans la protéine pIII. Nous avons analysé, par gel SDS-PAGE (**Figure 24A**), la présence de nos nanobodies dans les extraits périsplasmiques préparés à partir de cultures bactériennes exprimant B03, B20 et B90. L'analyse du gel montre la présence d'une bande de taille équivalente à celle de notre nanobody fusionné au tag HA (17 kDa). Nous avons également réalisé un *Western Blot* (**Figure 24B**) à l'aide d'un anticorps primaire anti-HA et d'un anticorps secondaire directement couplé à une peroxydase afin de confirmer l'expression de nos nanobodies. L'analyse du *Western Blot* confirme bien que les bandes d'une taille de 17 kDa, observées sur gel SDS, correspondent à nos nanobodies. Nous avons donc décidé d'utiliser ces extraits pour des expériences de mesure d'interaction par interférométrie laser après avoir exécuter une dialyse dans une solution tampon adéquate.

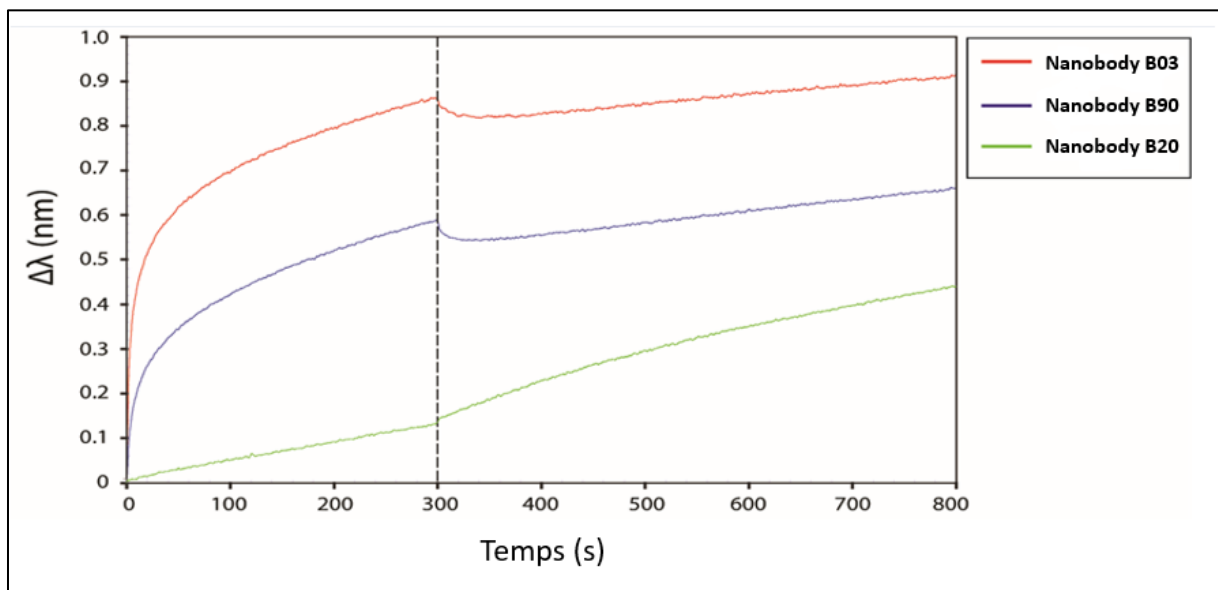


Figure 25 : Mesures d'association (300 S) et de dissociation (500 S), par interférométrie laser, des extraits périplasmiques comprenant nos trois nanobodies avec la fusion $\phi\text{BC1-rib}_{\text{glmS}}$. La courbe en rouge illustre l'association et la dissociation du nanobody B03, la courbe en bleu, celles du nanobody B90 et la courbe en vert, celles pour le nanobody B20.

4.2. Mesure d'interaction de nos nanobodies B03, B20 et B90 avec l'ARN fusion ϕ BC1-rib_{gImS} par interférométrie Laser (BLI)

L'interférométrie laser (BLI) a comme avantage de permettre des mesures d'interaction directement sur des extraits périsplasmiques ou sur des lysats cellulaires dû à sa très grande sensibilité et à la possibilité d'immobiliser spécifiquement des molécules présentes dans ces extraits à l'aide de divers senseurs [34]. Nous avons donc utilisé des extraits périsplasmiques de nos trois nanobodies de manière à vérifier leur interaction avec ϕ BC1-rib_{gImS} et d'éliminer d'éventuels faux-positifs révélés par l'ELISA qui a suivi l'étape de sélection par *phage display*. Étant donné la co-expression de nos nanobodies avec un tag HA, nous avons utilisé un système multicouche assez complexe, faisant intervenir un biosenseur anti-souris et un anticorps de souris anti-HA (*cfr* § 3.4.2).

Nous pouvons constater, sur base de la **Figure 25**, que les nanobodies B03 et B90 interagissent avec l'ARN ϕ BC1-rib_{gImS}. Par contre, aucune interaction n'est observée pour le nanobody B20. De plus, les complexes formés semblent stables. En effet, on observe une cinétique d'association assez rapide tandis que la cinétique de dissociation est lente.

Nous en avons donc conclu que seuls les nanobodies B03 et B90 étaient exploitables pour la suite des expériences et que le nanobody B20 correspondait à un faux-positif du test ELISA réalisé précédemment.

4.3. Sous-clonages des séquences codant pour les nanobodies B03 et B90 dans le vecteur pHEN6

Les nanobodies B03 et B90, exprimés à partir d'un vecteur pHEN4, possèdent un tag HA à leur extrémité C-terminale, ce qui ne facilite pas les étapes de purification ultérieures et les mesures d'interaction par BLI. De ce fait, nous avons réalisé des sous-clonages dans le vecteur pHEN6 qui, comme mentionné dans la section matériel et méthodes, permet l'expression de nos nanobodies en fusion avec un tag His_{x6}, facilitant la purification du nanobody par chromatographie d'affinité pour le Nickel ainsi que l'immobilisation directe de nos nanobodies purifiés sur un biosenseur anti-His pour les expériences de mesure d'interaction par BLI.

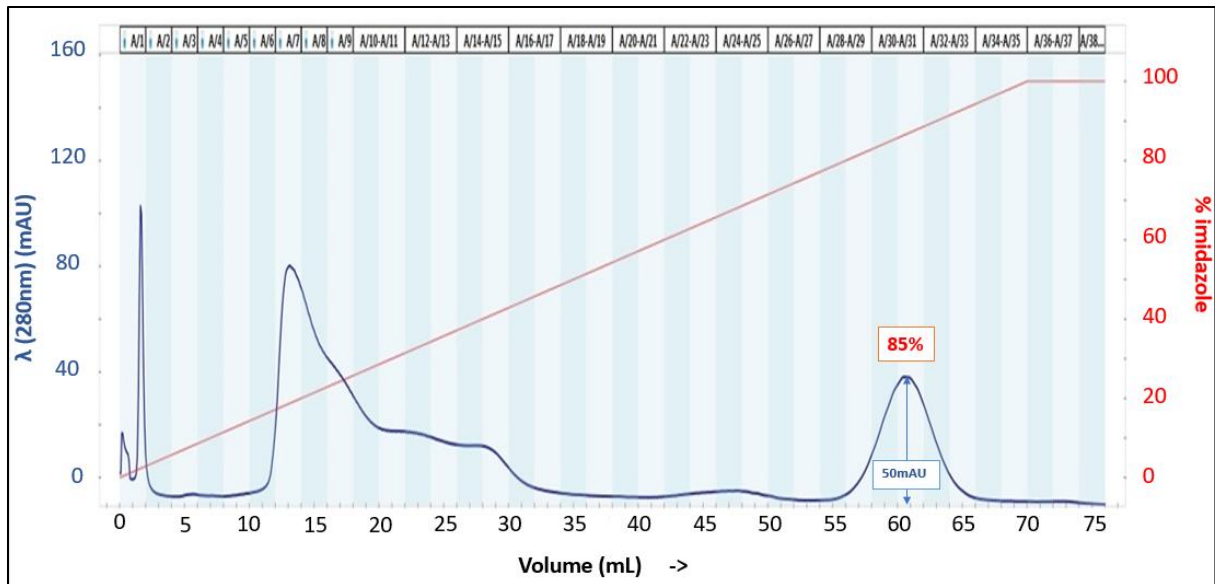


Figure 26 : Chromatogramme typique obtenu lors de la purification par chromatographie d'affinité de B03 à partir d'extrait périplasmique. L'absorbance à 280 nm (bleu) est suivie durant l'élution de la protéine, le pourcentage en imidazole (rouge) est également présenté. Le nanobody B03 est élué à 85 % en imidazole alors que la plupart des contaminants accrochés sur la colonne sont élués vers 20-30 % en imidazole. Les différentes fractions récoltées sont indiquées au-dessus du chromatogramme.

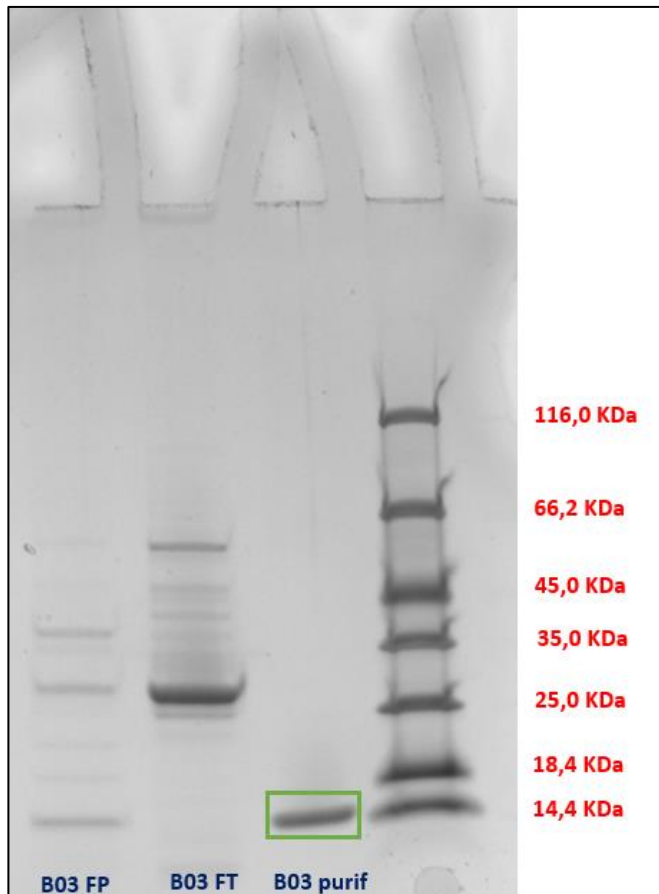


Figure 27 : Gel SDS représentant la charge (fraction périplasmique FP), le flow-through (FT), récolté lors de du chargement de l'extrait périplasmique et enfin, l'échantillon de protéines purifiées par chromatographie d'affinité. L'encadré en vert met en évidence la bande correspondant à notre nanobody d'intérêt.

Les sous-clonages de nos deux nanobodies, dans le vecteur pHEN6, ont été réalisés suivant un protocole détaillé dans la section matériels et méthodes au § 3.1.2. Ce dernier consistait en une ligation effectuée à partir d'inserts (gènes encodant nos nanobodies) et du vecteur pHEN6 digéré par les mêmes enzymes de restriction afin de générer des extrémités compatibles. L'intégrité de la séquence des clones, ayant intégré un insert, a été vérifiée par séquençage.

4.4. Expression du nanobody B03 à partir du vecteur pHEN6 et purification du nanobody par chromatographie d'affinité et chromatographie échangeuse de cations

L'expression de nos nanobodies a été réalisée, comme détaillée dans la section matériel et méthode (*cfr* § 3.2.1), dans le périplasme d'*E.coli* (souche Wk6) en milieu riche après une nuit d'induction à l'IPTG. Par la suite, une extraction périplasmique fut réalisée avant de procéder à une purification de nos nanobodies par chromatographie d'affinité pour le nickel. Différentes températures, différents milieux et moments d'induction et de concentration en IPTG ont été testées, mais seule l'expression de B03 a été détectée, aucune production n'ayant été obtenue pour le nanobody B90. De ce fait, nous nous sommes focalisés sur l'expression, la purification et la caractérisation de B03 dans le cadre de ce travail de fin d'étude.

4.4.1. Purification de B03 à partir d'extraits périplasmiques :

Un chromatogramme typique de purification du nanobody B03 par chromatographie d'affinité est présenté à la **Figure 26** et illustre l'évolution de l'absorbance à 280 nm en fonction du gradient en imidazole. Nous constatons un premier pic d'absorbance à 280 nm, aux alentours de 25 à 35 % (140 mM) en imidazole et correspondant à des contaminants. Un deuxième pic d'absorbance à 280 nm est également présent à 85 % (425 mM) en imidazole et correspond à notre nanobody. L'analyse, par gel SDS-PAGE (**Figure 27**), de la charge (fraction périplasmique FP), de la fraction non-accrochée (*flow-through FT*) et enfin, des différentes fractions éluées à un pourcentage en imidazole de 85 %, indiquent la présence de notre nanobody (bande d'une taille avoisinant 14,5 kDa) dans la charge, ainsi que dans les fractions éluées à 85% en imidazole. Par contre, nous ne retrouvons pas de nanobodies dans la fraction non-accrochée (FT).

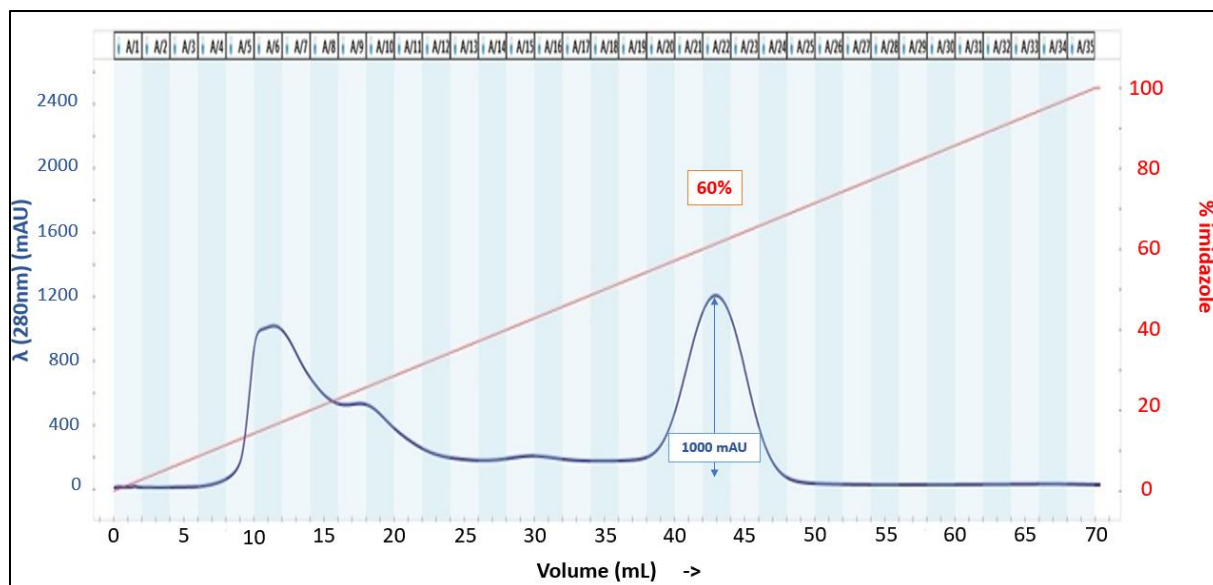


Figure 28 : Chromatogramme typique obtenu lors de la purification par chromatographie d'affinité de B03, à partir d'un lysat cellulaire total. L'absorbance à 280 nm (bleu) est suivie durant l'élution de la protéine ; le pourcentage en imidazole (rouge) est également présenté. Le nanobody B03 est élué à 60 % en imidazole alors que la plupart des contaminants accrochés sur la colonne sont élués vers 20-30 % en imidazole. Les différentes fractions récoltées sont indiquées au-dessus du chromatogramme.

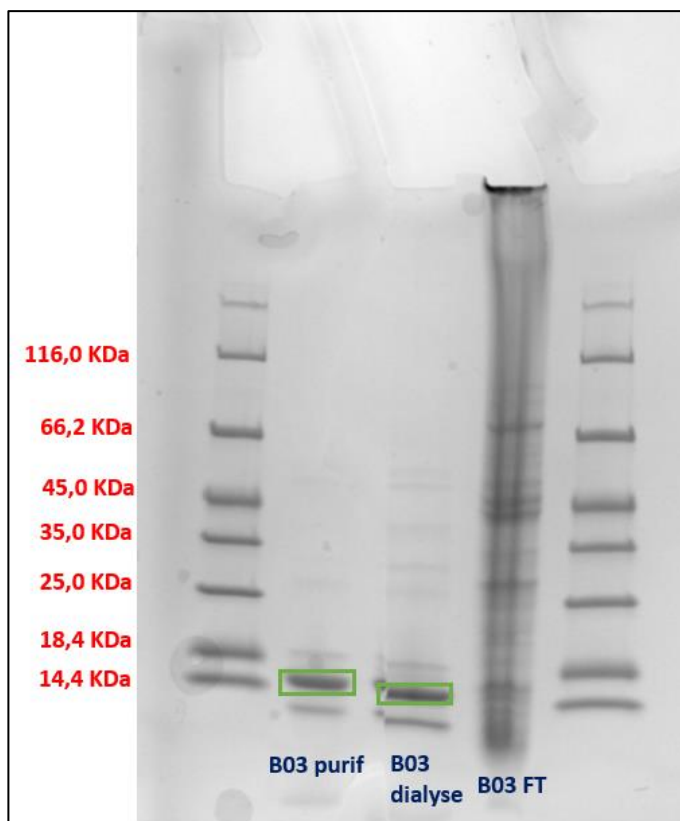


Figure 29 : Gel SDS représentant l'échantillon de protéines purifiées par chromatographie d'affinité ; cette même solution protéique mais après une étape de dialyse ; le *flow-through* (FT) récolté lors du chargement du lysat cellulaire sur la colonne. L'encadré en vert met en évidence la bande correspondant à notre nanobody d'intérêt.

De plus, le gel SDS semble démontrer une certaine pureté de l'échantillon protéique issu de la chromatographie d'affinité. Cependant, la quantité de protéines pures récupérées à l'issue de ce protocole de purification est très faible car nous atteignons environ 300 à 500 µg de protéines par litre de culture.

Ces observations nous ont conduit à changer et à optimiser le protocole d'extraction du nanobody afin d'augmenter la quantité de protéines récoltées.

4.4.2. Purification de B03 à partir de lysats cellulaires

Nous avons donc décidé de réaliser une lyse cellulaire totale suivie d'une chromatographie d'affinité, de manière à récupérer davantage de protéines.

4.4.2.1. Purification par chromatographie d'affinité pour le nickel

Le chromatogramme résultant de la purification par affinité du nanobody B03, obtenu à partir de lysats cellulaires totaux, est présenté à la **Figure 28**. Ce dernier ressemble très fort au chromatogramme de la chromatographie réalisée à partir d'extraits périplasmiques. En effet, nous retrouvons, de nouveau, un pic d'absorbance à 280 nm élué à un pourcentage en imidazole de 20 % (100 mM), qui correspond à des contaminants, ainsi qu'un pic d'absorbance à 280 nm élué à un pourcentage en imidazole de 60 % (300 mM) et qui correspond à notre nanobody. L'analyse de ces fractions sur gel SDS (**Figure 29**) montre la présence d'une bande aux alentours de 14,5 kDa, correspondant à notre nanobody. Cependant, nous constatons également la présence de quelques contaminants, dont un, plus important, de poids moléculaire légèrement inférieur à 14,4 kDa qui pourrait être, potentiellement, un produit de dégradation du nanobody. De plus, nous ne retrouvons pas de bande caractéristique de notre protéine dans la fraction non-accrochée (FT), ce qui laisse supposer que l'entièreté de notre protéine s'est accrochée sur la colonne. Après avoir réalisé une dialyse de la protéine purifiée dans le but d'enlever l'imidazole, les contaminants étaient toujours présents. Nous avons donc réalisé une étape supplémentaire de purification afin d'augmenter la pureté de l'échantillon.

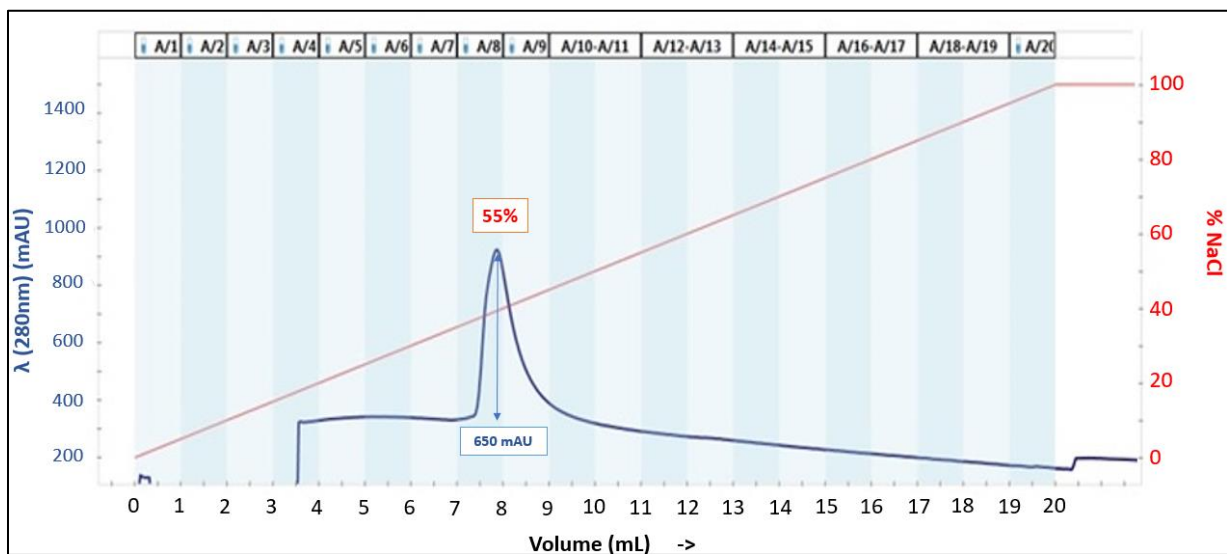


Figure 30 : Chromatogramme typique obtenu lors de la seconde étape de purification du nanobody B03 par chromatographie échangeuse de cations. L'absorbance à 280 nm mesurée est représentée par la courbe en bleue, tandis que le pourcentage en NaCl est présenté par la courbe en rouge. B03 a été élué à 40 % (400 mM) du gradient en NaCl. Les différentes fractions récoltées sont indiquées au-dessus du chromatogramme.

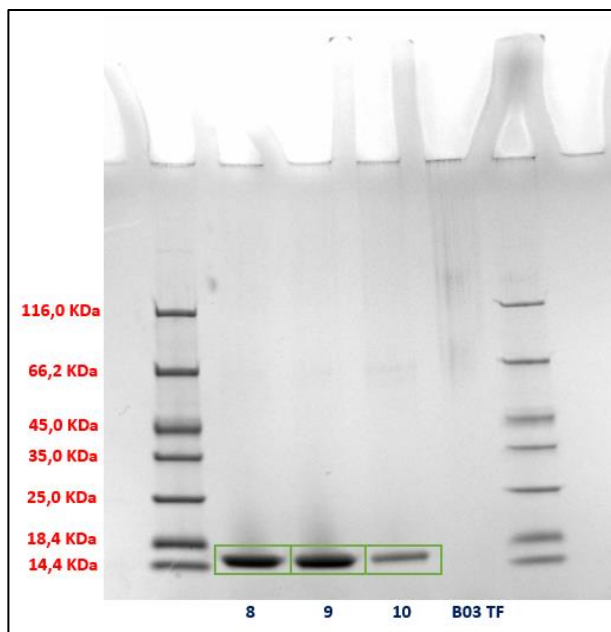


Figure 31 : Gel SDS représentant les différentes fractions correspondant au pic (absorbance à 280 nm) d'élution de la chromatographie échangeuse de cations, ainsi que le *flow-through* (FT) récolté lors du chargement de la solution protéique issue de la chromatographie d'affinité et dialysée. L'encadré en vert met en évidence la bande correspondant à notre nanobody.

Notre choix s'est porté sur la chromatographie échangeuse d'ions. La solution de protéines semi-purifiées a donc été dialysée dans un tampon permettant de diminuer la concentration en sel (NaCl) à 20 mM et ainsi, favoriser l'accrochage de l'intégralité de la protéine sur une colonne échangeuse d'ions.

4.4.2.2. Purification par chromatographie échangeuse de cations

Nous avons décidé de réaliser une chromatographie échangeuse de cations afin d'augmenter la pureté de notre échantillon de protéines. En effet, notre nanobody possède un point isoélectrique de 9,6. Il est donc globalement chargé positivement à pH neutre. Nous avons utilisé une colonne de haute résolution afin de permettre l'élimination des derniers contaminants résiduels de l'échantillon protéique.

La **Figure 30** représente un chromatogramme typique obtenu pour l'élution du nanobody à l'aide d'un gradient de NaCl. Nous observons un pic d'absorbance à 280 nm élué à un pourcentage en sel de 40 % (400 mM), ce qui correspond à notre nanobody. Toutes les fractions éluées, qui correspondent au pic d'élution, ainsi que la fraction non-accrochée (FT), récoltée lors de la charge de la solution protéique, ont été analysées sur gel SDS (**Figure 31**). Nous constatons que les fractions 8, 9, 10 contiennent notre nanobody avec la présence d'une bande caractéristique à 14,5 kDa. De plus, aucun contaminant n'est visualisable sur le gel, ce qui suggère que notre solution protéique est pure.

La purification de notre nanobody à partir d'un lysat cellulaire, par le biais d'une chromatographie d'affinité et une chromatographie échangeuse de cations, permet donc d'obtenir une solution pure de nanobodies avec des rendements avoisinant 3 mg de protéines par litre de culture. Ces rendements sont donc largement supérieurs à ceux obtenus à partir d'extraits périsplasmiqes.

Afin de confirmer le niveau de pureté de notre échantillon ainsi que la nature de la protéine purifiée, une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée (*cfr* § 3.2.3). Cette vérification nous a permis de nous assurer que la protéine purifiée était mature et ne contenait plus son peptide signal. De plus, la comparaison des spectres réalisés pour la forme réduite et non-réduite de l'échantillon indique la présence d'un pont disulfure dans l'échantillon non-réduit, ce dernier étant essentiel à la stabilité de notre nanobody.

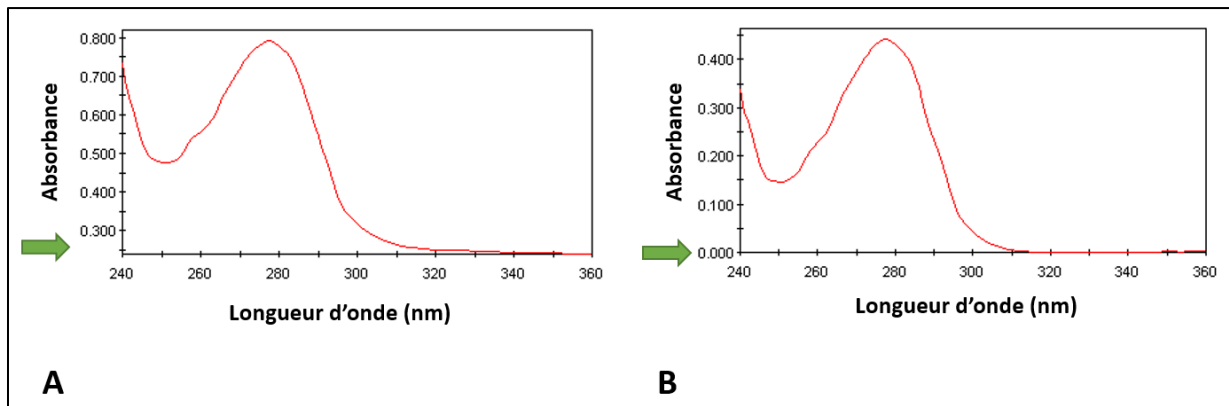


Figure 32 : Spectres d'absorbance UV, mesurés entre 240 nm et 340 nm, d'une solution pure de nanobodies B03 conditionnée dans un tampon TRIS 50 mM, NaCl 150 mM (A) et dans un tampon HEPES 50 mM, NaCl 150 mM (B). Les spectres des solutions tampons correspondantes ont été également mesurés et utilisés comme blanc. À noter que l'échelle d'absorbance pour les deux spectres est différente puisqu'elle débute à 0,250 pour le spectre A et à 0 pour le spectre B (flèche verte).

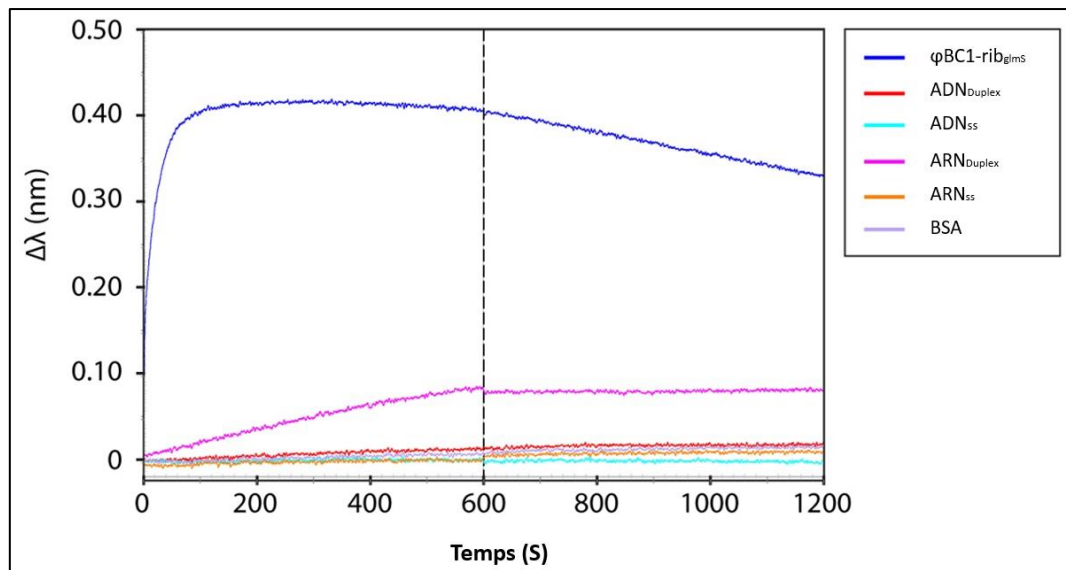


Figure 33 : Profil d'association et de dissociation du nanobody B03 avec l'ARN ϕ BC1-rib_{glmS} (bleu foncé), ainsi qu'entre le nanobody B03 et plusieurs contrôles négatifs. Ces contrôles sont un duplex d'ADN en rouge (ACTG_{6x}), un ADN simple brin en turquoise (ACTG_{6x}), un duplex d'ARN en magenta (ACUG_{6x}), un ARN simple brin en orange (ACUG_{6x}) et enfin la BSA en gris. Les associations et les dissociations ont été mesurées sur un temps de 600 secondes. Cette expérience a été réalisée deux fois de manière indépendante et a eu recours à des concentrations de 100 nM pour l'ARN tout comme pour les différents contrôles. Une concentration de 58 nM pour le chargement de la protéine a été employée. Toutes ces expériences ont été réalisées dans une solution tampon suppléée avec du MgCl₂.

4.5. Stabilisation du nanobody dans différentes conditions en tampon

Après purification, la protéine a été dialysée et conditionnée dans une solution tampon contenant du TRIS 50 mM pH 7 et du NaCl 150 mM. Cependant, nous nous sommes rendu compte que cette dernière avait tendance à s'agréger dans ce tampon.

En effet, un spectre d'absorbance UV de l'échantillon de protéines effectué de 240 nm à 340 nm (**Figure 32A**) montre la présence d'un pic d'absorbance avec un maximum situé à 280 nm résultant de l'absorbance de résidus aromatiques (principalement Trp et Tyr) du nanobody. Néanmoins, nous observons également que l'absorbance de la solution ne redescend pas à 0 après 300-320 nm, ce qui indique la formation d'agrégats. L'échantillon de protéines a donc été dialysé dans des solutions contenant des tampons différents ainsi que divers sels et additifs permettant d'augmenter la solubilité des protéines. Des résultats encourageants ont été obtenus en utilisant une solution contenant un tampon HEPES 50 mM pH 7, NaCl 150 mM. Dans cette solution, notre nanobody présente le spectre typique d'une protéine soluble, ne formant pas d'agrégats, avec un pic d'absorbance centré sur 280 nm, ainsi qu'une absorbance qui redescend par la suite à 0 vers 300-320 nm (**Figure 32B**). Nous avons donc décidé de conserver nos protéines et de faire toutes nos mesures d'interaction dans cette solution tampon.

4.6. Etudes de la spécificité du nanobody B03 pour ϕ BC1-rib_{glnS}

Dans un premier temps, nous avons étudié la spécificité d'interaction du nanobody B03. D'une part, nous avons déterminé si le nanobody B03 était spécifique de l'ARN_{st} ϕ BC1-rib_{glnS}, ou si, au contraire, il lie diverses molécules (ex : ADN, etc...). D'autre part, nous avons également étudié la capacité de discrimination de B03 pour ϕ BC1-rib_{glnS} parmi d'autres ARN_{st}.

4.6.1. Spécificité du nanobody B03 pour l'ARN_{st}

Nous avons réalisé des mesures d'interaction entre le nanobody B03 purifié et ϕ BC1-rib_{glnS} généré par transcription *in vitro*. De plus, différents contrôles négatifs ont été utilisés afin de vérifier cette spécificité de B03 pour l'ARN structuré (*cfr* § 3.4.3) (**Figure 33**).

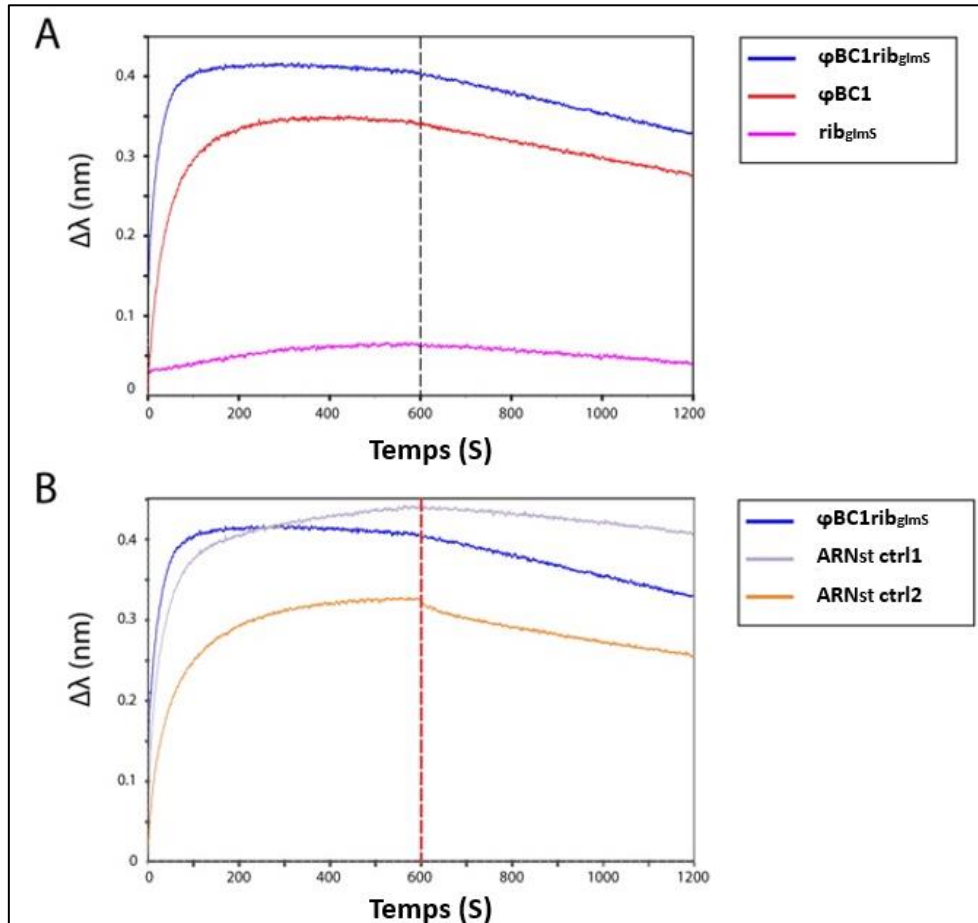


Figure 34 : Profils d'association et de dissociation du nanobody B03 avec $\phi\text{BC1-ribglmS}$ (bleu), ϕBC1 (rouge), le ribozyme glmS (magenta) ainsi qu'avec deux ARN_{st} contrôles qui sont P4P6 (159 nt) pour le contrôle 1 (gris) et G22 (283 nt) pour le contrôle 2 (orange). Les associations et les 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 MgCl_2 . Les concentrations en protéines et en ARNs utilisées sont respectivement de 58 nM et de 100 nM.

Comme nous pouvons le voir sur les différents profils d'association et de dissociation, le nanobody présente une vitesse d'association très rapide avec l'ARN fusion ainsi qu'une cinétique de dissociation très lente. Cependant, aucune interaction entre B03 et l'ensemble des contrôles négatifs utilisés n'est détectée. Ces contrôles incluent de l'ADN simple brin et sous forme de duplex, la BSA (une protéine chargée négativement à pH neutre) ainsi qu'un ARN simple brin et sous forme de duplex. Nous avons conclu que le nanobody était capable d'interagir de manière spécifique avec de l'ARN structuré.

4.6.2. Spécificité du nanobody B03 pour l'ARN_{st} ϕ BC1-rib_{glmS}

Après avoir observé une certaine spécificité pour l'ARN_{st}, nous avons tenté d'identifier le partenaire de l'ARN fusion, ϕ BC1 ou rib_{glmS}, qui est reconnu par le nanobody. De plus, nous avons étudié le pouvoir de discrimination de B03 pour ϕ BC1-rib_{glmS} parmi d'autres ARNs_{st}. Des expériences d'interactions qualitatives ont donc été réalisées par interférométrie laser du nanobody B03 avec ϕ BC1-rib_{glmS}, ϕ BC1 isolé, rib_{glmS} isolé, ainsi qu'avec différents contrôles ne reprenant, cette fois-ci, que des ARNs_{st}. Le système expérimental ainsi que les concentrations utilisées sont exactement les mêmes que celles décrites ci-dessus (*cfr* § 3.4.3).

Dans un premier temps, nous constatons une interaction forte du nanobody B03 à la fois pour ϕ BC1-rib_{glmS} et pour ϕ BC1, alors qu'aucune interaction n'est observée pour le ribozyme glmS (**Figure 34A**). Ce résultat suggère que le nanobody interagit avec le domaine ϕ BC1 de l'ARN fusion et non pas au niveau du ribozyme glmS. De même, ces résultats semblent également suggérer une absence d'interférence du nanobody avec l'activité catalytique du ribozyme glmS.

Les mesures d'interaction réalisées avec d'autres ARNs_{st}, tels que G22 et P4P6, montrent une interaction de ceux-ci avec le nanobody (**Figure 34B**). Ces données suggèrent que le nanobody B03 présente une spécificité pour l'ARN_{st}, mais cette spécificité n'est pas stricte pour ϕ BC1-rib_{glmS} (plus précisément pour ϕ BC1) puisque d'autres ARNs_{st} sont reconnus. Néanmoins, il importe de mentionner que notre fragment d'anticorps présente une certaine spécificité pour certains ARNs_{st}, car ce dernier ne lie pas le ribozyme glmS. De même, des mesures d'interaction entre BC1 et B03 n'ont montré aucune interaction, résultats qui seront présentés et discutés plus en détail dans la section conclusion et qui confirment l'aptitude du nanobody B03 à discriminer certains ARNs_{st} parmi d'autres, même si cette spécificité n'est pas stricte pour un seul ARN_{st}. L'hypothèse la plus probable indiquerait que ce dernier serait capable de reconnaître davantage un élément de structure secondaire ou un arrangement de structures secondaires communs aux différents ARNs_{st}.

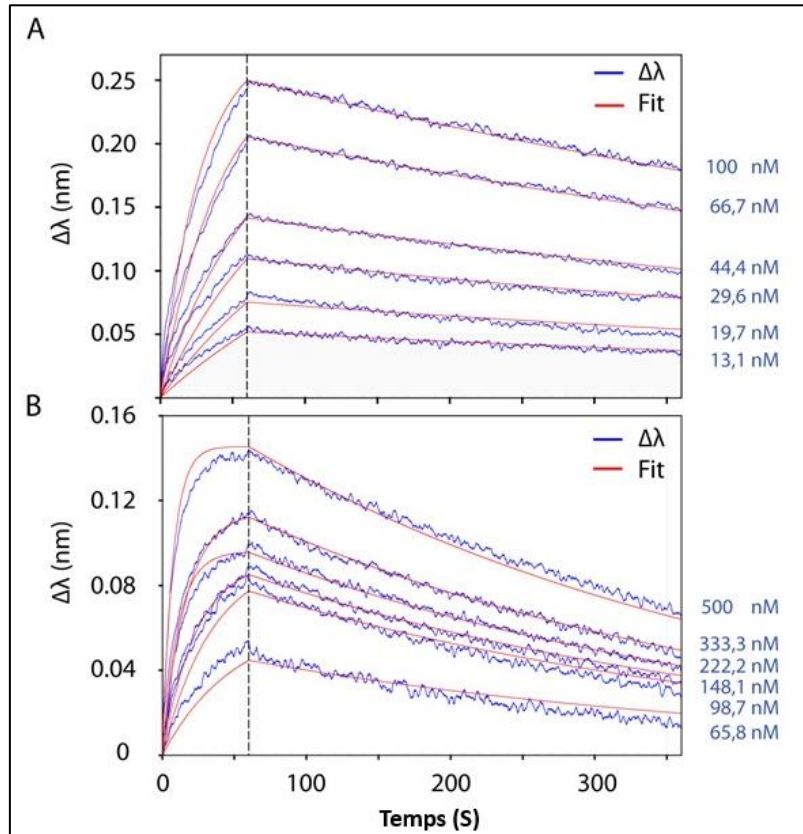


Figure 35 : Mesures quantitatives de l'interaction entre le nanobody B03 et l'ARN fusion $\phi\text{BC1-rib}_{\text{gims}}$ en présence de MgCl_2 (A) et en présence d'EDTA (B). La concentration en protéines utilisée est de 58 nM pour toutes ces expériences. Au moins 6 concentrations différentes en ARNs ont été utilisées et sont indiquées à droite de la figure à côté de chaque courbe. Les associations ont été mesurées pendant 60 secondes et les dissociations pendant 300 secondes. Les courbes mesurées sont représentées en bleu tandis que le modèle utilisé pour ajuster les données expérimentales (Fit) est illustré en rouge.

Pour tester cette hypothèse, nous avons donc réalisé des mesures d'interaction en présence d'EDTA. Cet agent chélatant déstabilise fortement la structure 3D des ARNs_{st} par chélation des ions Mg²⁺, tout en conservant le contenu en structures secondaires (**Annexe 9**). Les résultats obtenus sont très semblables à ceux observés en présence de MgCl₂, avec des interactions toutes aussi fortes, confirmant ainsi l'hypothèse selon laquelle le nanobody serait capable de reconnaître davantage un épitope constitué de structure(s) secondaire(s) plutôt qu'un épitope présent dans la structure tertiaire de l'ARN_{st}.

Nous pouvons donc conclure que le nanobody B03 possède une certaine spécificité quant à la reconnaissance de l'ARN_{st}, mais que cette reconnaissance n'est pas stricte, puisque différents ARNs_{st} sont reconnus, laissant sous-entendre la possibilité d'une interaction avec un/des élément(s) de structure secondaire partagée(s) entre ces différents ARNs, plutôt qu'une structure tridimensionnelle.

4.7. Quantification de l'affinité du nanobody B03 contre ϕ BC1-rib_{gls} et ϕ BC1

L'interaction entre le nanobody B03 et les ARNs ϕ BC1-rib_{gls} et ϕ BC1, présentée ci-dessus, correspondent à des données qualitatives. Nous avons donc réalisé des essais quantitatifs dans le but de déterminer, pour chacune de ces interactions, des valeurs de constantes cinétiques d'association (k_{on}), de dissociation (k_{off}), et la constante d'équilibre de dissociation K_D liée aux constantes cinétiques par la relation suivante : $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Les différents paramètres cinétiques ont été évalués sur la base d'un fit global réalisé à partir d'au moins 6 concentrations en ARN différentes. Le modèle mathématique ajusté aux données expérimentales correspond à un modèle 1 : 1. Nous avons réalisé ces essais à la fois en présence de MgCl₂, qui stabilise la conformation tridimensionnelle de l'ARN [43] et en présence d'EDTA qui déstabilise la structure 3D de l'ARN afin de ne conserver que son contenu en structures secondaires. Le but de ces essais est de vérifier l'hypothèse selon laquelle le nanobody interagirait avec une structure secondaire.

Dans un premier temps, nous constatons que les cinétiques d'association entre ϕ BC1-rib_{gls} et le nanobody B03 sont particulièrement rapides tandis que les dissociations sont lentes, voire quasiment inexistantes, et ce, pour les deux conditions étudiées (MgCl₂ et EDTA) (**Figure 35 A et B**).

	Condition	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off} (s^{-1})$	$K_D (M^{-1})$
$\phi BC1\text{-rib}_{gls}$	MgCl ₂	$2,9 \pm 2,5 \times 10^5$	$1,7 \pm 1,0 \times 10^{-3}$	$2,3 \pm 0,8 \times 10^{-9}$
$\phi BC1\text{-rib}_{gls}$	EDTA	$3,5 \pm 1,2 \times 10^6$	$1,1 \pm 1,4 \times 10^{-4}$	$2,5 \pm 3,3 \times 10^{-11}$
$\phi BC1$	MgCl ₂	$2,6 \times 10^5$	$2,7 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-8}$
$\phi BC1$	EDTA	$6,9 \times 10^5$	1×10^{-7}	$1,0 \times 10^{-12}$

Table 1 : Détermination des paramètres cinétiques (k_{on} , k_{off}) et des constantes d'équilibre de dissociation (K_D) de l'interaction entre le nanobody B03 et $\phi BC1\text{-rib}_{gls}$ ainsi que $\phi BC1$. Ces mesures ont été évaluées à (au moins) 6 concentrations différentes en ARN qui ont été ajustées à un modèle d'interaction de type 1 : 1. Ces expériences ont été réalisées en présence de MgCl₂ et d'EDTA pour $\phi BC1\text{-rib}_{gls}$ et $\phi BC1$. Trois expériences ont été réalisées pour les mesures d'interaction avec $\phi BC1\text{-rib}_{gls}$. Faute de temps, seule une expérience a été réalisée pour $\phi BC1$ en présence d'EDTA et de MgCl₂. La concentration en protéine utilisée était de 58 nM pour toutes ces expériences.

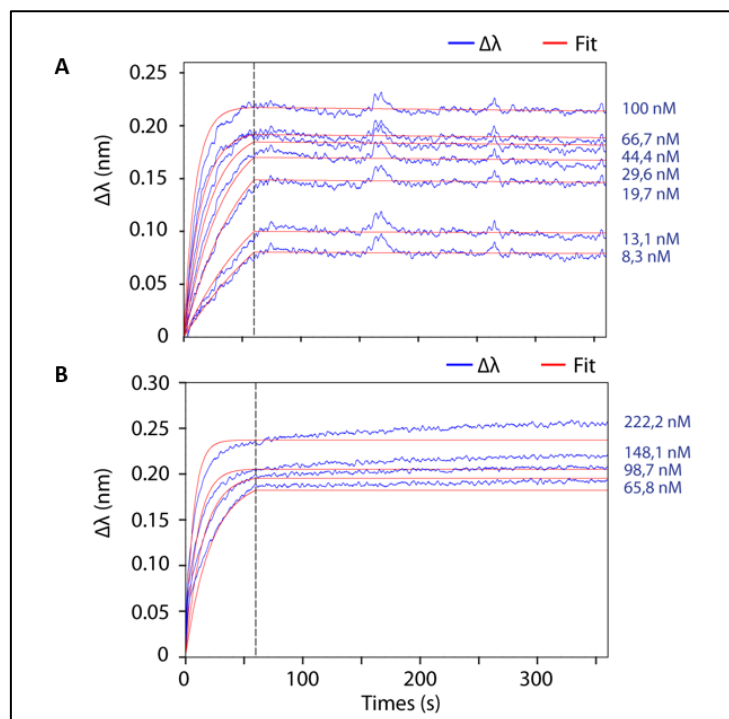


Figure 36 : Mesures quantitatives de l'interaction entre le nanobody B03 et l'ARN $\phi BC1$ en présence de MgCl₂ (A) et d'EDTA (B). La concentration en protéines utilisée est de 58 nM pour toutes ces expériences. 7 concentrations différentes en ARNs en condition MgCl₂ et 4 en condition EDTA ont été utilisées et sont indiquées à droite de la figure, à côté de chaque courbe. Les associations ont été mesurées pendant 60 secondes et les dissociations pendant 300 secondes. Les courbes mesurées sont représentées en bleu tandis que le modèle utilisé pour ajuster les données expérimentales (Fit) est illustré en rouge.

L'analyse des paramètres cinétiques (**Table 1**) indique que les k_{on} et k_{off} rentrent dans une gamme de valeurs attendue pour une interaction de type nanobody/antigène publiées dans la littérature [1], à savoir, entre 10^5 et 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ pour les cinétiques d'association et entre 10^{-3} et 10^{-4} s^{-1} pour les valeurs de vitesse de dissociation. La constante d'équilibre de dissociation, déduite des données cinétiques, de notre nanobody pour cet ARN est $2,3 \pm 0,8$ nM en présence de $MgCl_2$ et de 25 ± 33 pM en présence d'EDTA. Ces données indiquent que l'affinité de notre nanobody pour l'ARN fusion augmente d'un facteur 100 lorsque la structure tertiaire de l'ARN est déstabilisée et que les éléments de structure secondaire sont plus accessibles. Ce résultat conforte notre hypothèse selon laquelle le nanobody n'interagirait pas avec un épitope formé par la structure 3D, mais davantage avec une ou un ensemble de structures secondaires communes aux différents ARNs_{st} testés.

Les résultats d'interaction qualitative ont montré que le nanobody B03 interagissait avec la partie $\phi BC1$ de l'ARN fusion alors qu'aucune interaction n'était observable pour rib_{glmS} . Nous avons donc déterminé les paramètres cinétiques et thermodynamiques gouvernant l'interaction entre le nanobody et $\phi BC1$. Malheureusement, par manque de temps, nous n'avons pu réaliser ces essais qu'une seule fois. Ces données devront donc être reproduites afin de confirmer ces données de K_D préliminaires. Les résultats présentés à la **Figure 36** et à la **Table 1** sont très proches de ceux observés pour l'interaction avec $\phi BC1-rib_{glmS}$. Effectivement, les paramètres cinétiques sont semblables et donnent une valeur de K_D de 11 nM en condition $MgCl_2$, cette valeur étant du même ordre de grandeur que celle mesurée préalablement pour la fusion. La valeur de K_D mesurée en présence d'EDTA est de l'ordre du picomolaire et démontre de nouveau une interaction plus forte en présence de l'agent chélatant.

Nous pouvons donc conclure que le nanobody B03 interagit avec $\phi BC1$ avec une affinité comparable pour la forme isolée ou dans l'ARN fusion $\phi BC1-rib_{glmS}$. La présence du ribozyme $glmS$ n'a donc aucune influence sur l'interaction du nanobody avec $\phi BC1$. De plus, l'affinité plus forte observée en présence d'EDTA conforte l'hypothèse selon laquelle l'interaction du nanobody prend place au niveau d'un élément de structure secondaire.

Nous avons également tenté de conforter ces mesures d'affinité par d'autres méthodes comme l'*Isothermal titration calorimetry* (ITC) et la thermophorèse (*MicroScale Thermophoresis – MST*). Cependant, les résultats ne furent pas concluants. Par ailleurs, nous avons essayé de déterminer la stœchiométrie de la réaction par tamis moléculaire et *dynamic light scattering* (DLS). Malheureusement, ces expériences n'ont pas apporté de résultats probants.

4.8. Effet stabilisant du nanobody sur ϕ BC1-rib_{glmS} vis-à-vis de la dénaturation thermique

Dans la cadre de ces expériences, nous avons mis en place une approche expérimentale visant à étudier la stabilité thermique de notre ARN et à montrer un effet potentiel de notre nanobody sur cette stabilité. Pour ce faire, nous avons réalisé des cycles de dénaturation/renaturation de l'ARN, avec ou sans nanobodies, en suivant d'une part, le contenu en structures secondaires de notre ARN par dichroïsme circulaire et, d'autre part, en réalisant des tests d'activité catalytique du ribozyme glmS afin de vérifier la récupération de l'activité biologique de l'ARN après un cycle complet de dénaturation/renaturation.

4.8.1. Etude de la stabilité thermique de ϕ BC1-rib_{glmS} par dichroïsme circulaire

Comme nous avons pu le voir au § 3.5.1.1, le dichroïsme circulaire est couramment utilisé pour l'étude structurale de macromolécules puisqu'il est capable de déterminer leur contenu en structures secondaires et tertiaires par des mesures des signaux CD dans l'UV lointain et l'UV proche respectivement.

4.8.1.1. Etude de la stabilité du nanobody B03 par dichroïsme circulaire

Avant d'étudier la stabilité thermique de l'ARN et l'effet potentiel de son interaction avec le nanobody B03, nous avons analysé la stabilité de notre fragment d'anticorps par dichroïsme circulaire.

4.8.1.1.1. Spectre CD du nanobody B03

Dans un premier temps, nous avons réalisé un spectre CD du nanobody B03 afin de déterminer son contenu en structures secondaires et tertiaires afin de vérifier si ce profil de signaux CD correspondait à ce qui avait été déjà décrit dans la littérature pour un nanobody.

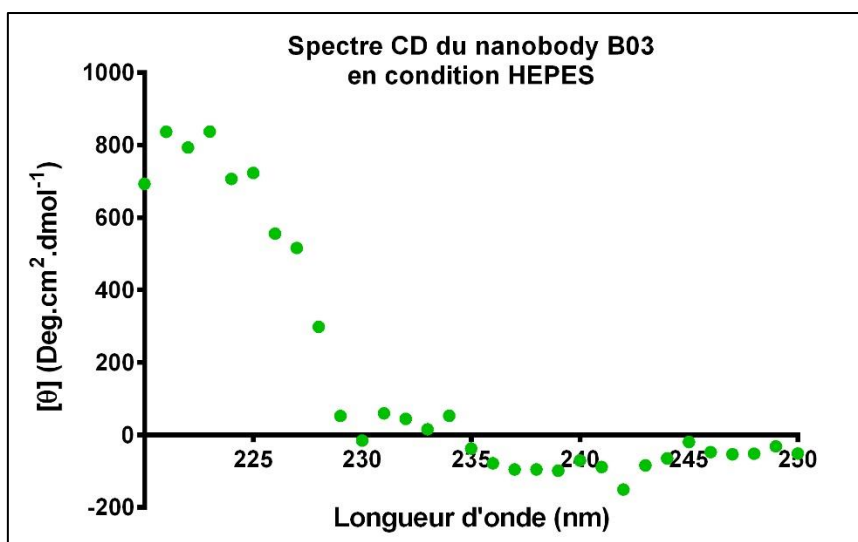


Figure 37 : Spectre CD du nanobody B03 dans une solution tampon HEPES 50 mM pH 7 et NaCl 150 mM. Le signal CD est exprimé en Deg.cm².dmol⁻¹ et est représenté sur une gamme de longueur d'onde allant de 220 à 250 nm. Ces mesures ont été réalisées pour une concentration en protéines de 13,6 μM et à une température de 25°C. Les signaux mesurés correspondent à une moyenne évaluée sur 4 secondes et 3 accumulations. Ce spectre a été réalisé trois fois dans la cadre d'expériences indépendantes.

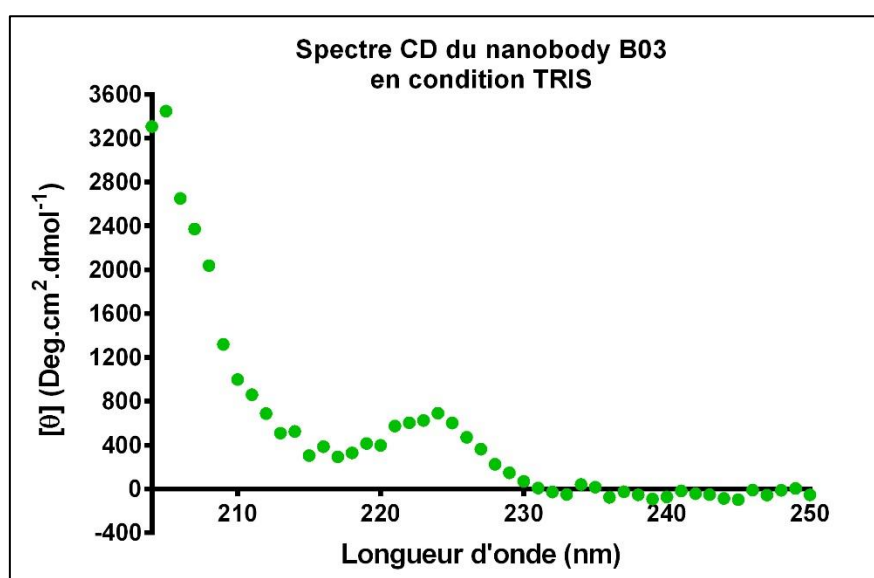


Figure 38 : Spectre CD du nanobody B03 dans une solution tampon TRIS 50 mM pH 7 et NaCl 150 mM. Le signal CD est exprimé en Deg.cm².dmol⁻¹ et est représenté sur une gamme de longueur d'onde allant de 200 à 250 nm. Ces mesures ont été réalisées pour une concentration en protéines de 13,6 μM et à une température de 25°C. Les signaux mesurés correspondent à une moyenne évaluée sur 4 secondes et 3 accumulations. Ce spectre a été réalisé deux fois dans le cadre d'expériences indépendantes.

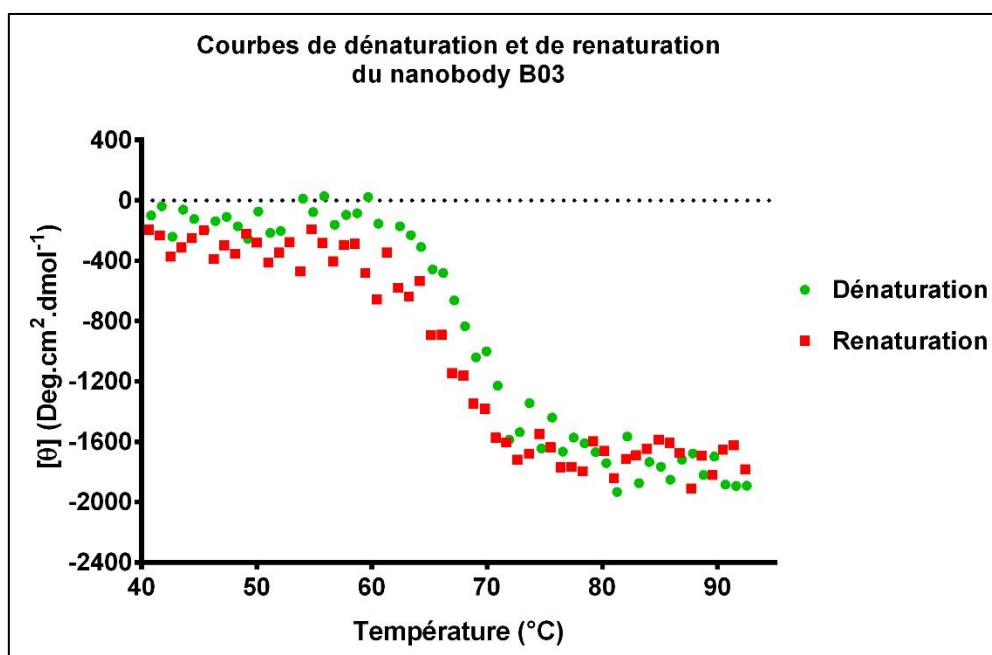


Figure 39 : Courbes de dénaturation et de renaturation thermique du nanobody B03, suivies à 223 nm et réalisées à une concentration en protéines de 13,6 μM . Le signal CD est exprimé en $\text{Deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ et est mesuré sur une gamme de température allant de 25 à 92 $^{\circ}\text{C}$, même si le spectre ne vous est présenté qu'à partir de 40 $^{\circ}\text{C}$. La courbe de dénaturation est représentée en vert, tandis que la courbe de renaturation est présentée en rouge. Trois expériences indépendantes ont été réalisées et ont montré des résultats identiques.

Pour ce faire, nous avons utilisé une solution de nanobodies concentrée à $13,6 \mu\text{M}$ et conservée dans une solution tampon HEPES 50 mM pH 7, NaCl 150 mM. Le spectre a été mesuré sur une gamme de longueur d'onde de 200 à 360 nm.

Un spectre CD représentatif est présenté à la **Figure 37** et montre un signal positif aux alentours de 223 nm indicatif de la présence de résidus aromatiques placés dans un environnement chimique particulier indicatif de la présence d'une structure tertiaire stable [37]. Cependant, le tampon HEPES n'est pas un tampon adéquat pour des études de dichroïsme circulaire car ce dernier a tendance à absorber à des longueurs d'onde en dessous de 220 nm [35]. De ce fait, un spectre du nanobody B03 a également été réalisé dans une solution tampon TRIS 50 mM pH 7 et NaCl 150 mM (**Figure 38**), le TRIS ayant moins d'influence sur le signal CD dans cette gamme de longueur d'onde, afin de visualiser les signaux CD de notre protéine dans une gamme de longueurs d'ondes inférieure à 220 nm. En plus du signal positif observé à 223 nm, on détecte un signal positif est également visible à 203 nm, ce dernier résultant de la présence de liens peptidiques contenus dans les feuillets β antiparallèles du nanobody [37].

Ces différents spectres CD ont donc permis de mettre en évidence certaines caractéristiques typiques des immunoglobulines, et suggèrent une conformation native de notre nanobody.

4.8.1.1.2. Courbes de dénaturation et de renaturation du nanobody B03

Des courbes de dénaturation et de renaturation du nanobody B03 ont été réalisées dans le but de caractériser sa stabilité thermique, suivant le protocole décrit dans la section matériel et méthodes au § 3.5.1.3. Nous avons mesuré cette dénaturation et renaturation thermique sur une gamme de température allant de 25 à 92 °C et à une longueur d'onde de 223 nm, car c'est à cette longueur d'onde que l'intensité du signal CD du spectre du nanobody est la plus importante.

Les résultats présentés à la **Figure 39** montrent que la dénaturation thermique du nanobody semble suivre un système coopératif à 2 états, avec une transition bien marquée entre un état natif et un état dénaturé de la protéine sans passer par des états intermédiaires [37]. Ce comportement est similaire à celui observé dans le cadre des protéines globulaires.

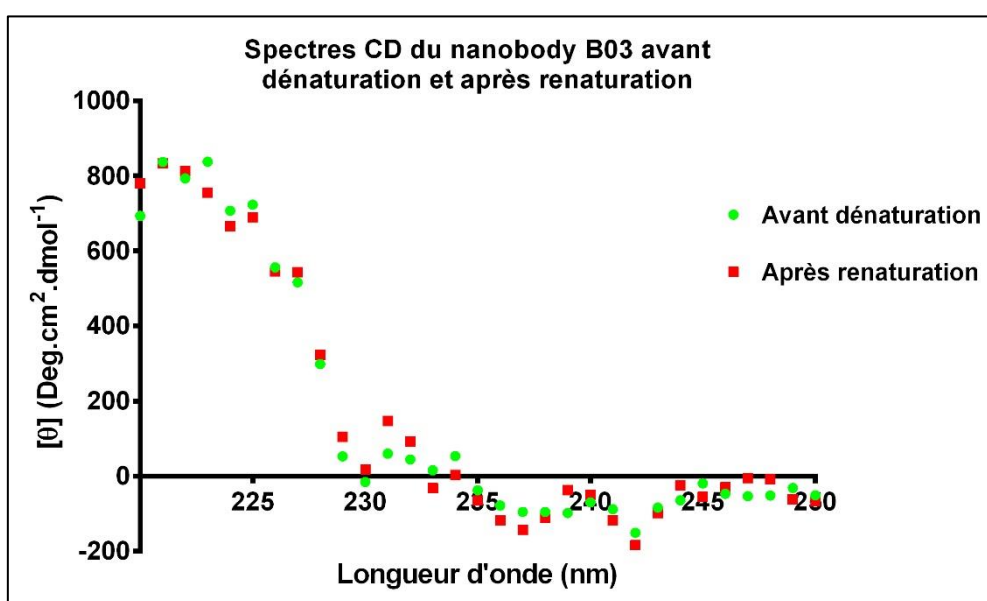


Figure 40 : Comparaison des spectres CD du nanobody B03 dans une solution tampon HEPES 50 mM pH 7 et NaCl 150 mM, avant dénaturation (vert) et après renaturation (rouge). Le signal CD est exprimé en $\text{Deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ et est représenté sur une gamme de longueur d'onde allant de 220 à 250 nm. Ces spectres ont été réalisés trois fois dans le cadre d'expériences indépendantes.

Nous avons mesuré des valeurs de température de dénaturation apparente (T_m^*), en ajustant ces données expérimentales sur un modèle mathématique sigmoïdal faisant intervenir le coefficient de Hill. Le T_m^* de dénaturation du nanobody est de $68,4 \pm 0,4$ °C, tandis que son T_m^* de renaturation est de $65,4 \pm 0,6$ °C. Notre nanobody est donc très stable vis-à-vis de la dénaturation thermique et rentre dans la gamme de T_m^* variant de 60 à 80 °C. Les protéines qui présentent un T_m^* dans cette gamme de température sont décrites dans la littérature comme thermostables [1].

Nous constatons également que le comportement de dénaturation et de renaturation du nanobody sont fort semblables, ce qui laisse sous-entendre une récupération de son contenu en structures tertiaires.

Il est important de mentionner que nous préférons utiliser la terminologie de T_m^* apparent car nous n'avons pas mesuré l'activité biologique du nanobody, avant et après un cycle complet de dénaturation/renaturation. C'est pourquoi nous ne pouvons pas attester formellement de la réversibilité de cette dénaturation et employons donc la terminologie de T_m^* .

4.8.1.1.3. Comparaison des spectres CD du nanobody B03 avant dénaturation et après renaturation

Nous avons également étudié la réversibilité de la dénaturation thermique du nanobody en mesurant le contenu en structures tertiaires de ce dernier après un cycle de dénaturation/renaturation. La comparaison des spectres CD, avant dénaturation et après renaturation, a été réalisée et est présentée à la **Figure 40**. Nous observons que ces deux spectres se superposent parfaitement, ce qui suggère un retour à une conformation native du nanobody après le cycle de dénaturation/renaturation.

L'ensemble de ces résultats met en évidence une grande stabilité thermique du nanobody B03. Nous en avons donc conclu qu'il était possible d'utiliser ce nanobody afin de voir un potentiel effet sur la stabilité thermique de l'ARN.

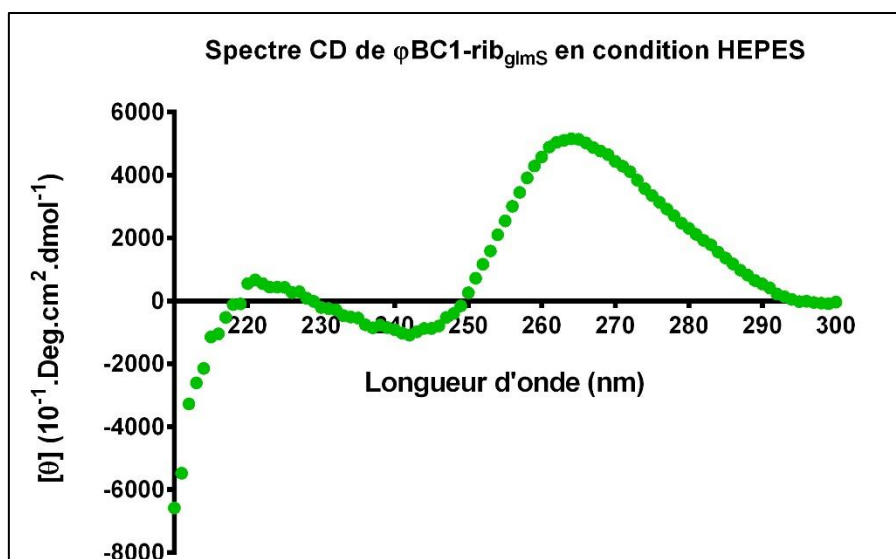


Figure 41 : Spectre CD de l'ARN ϕ BC1-rib_{glmS} dans une solution tampon HEPES 50 mM pH 7, NaCl 150 mM et MgCl₂ 10 mM. Le signal CD est exprimé en $10^{-1}.\text{Deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ et est représenté sur une gamme de longueur d'onde allant de 210 à 300 nm. Ces mesures ont été réalisées pour une concentration en ARN de 500 nM et à une température de 25°C. Les signaux mesurés correspondent à une moyenne évaluée sur 4 secondes et 3 accumulations. Ce spectre a été réalisé cinq fois dans le cadre d'expériences indépendantes.

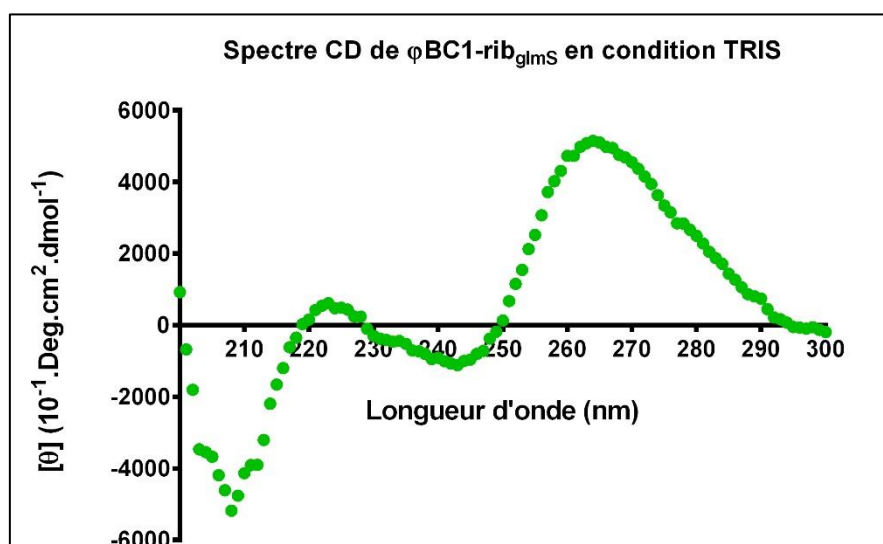


Figure 42 : Spectre CD de l'ARN ϕ BC1-rib_{glmS} dans une solution tampon TRIS 50 mM pH 7, NaCl 150 mM et MgCl₂ 10 mM. Le signal CD est exprimé en $10^{-1}.\text{Deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ et est représenté sur une gamme de longueur d'onde allant de 200 à 300 nm. Ces mesures ont été réalisées pour une concentration en ARN de 500 nM et à une température de 25°C. Les signaux mesurés pour chaque longueur d'onde correspondent à des moyennes évaluées sur 4 secondes et 3 accumulations. Ce spectre a été réalisé deux fois dans le cadre d'expériences indépendantes.

4.8.1.2. Etude de la stabilité de l'ARN ϕ BC1-rib_{gImS} par dichroïsme circulaire

Nous avons réalisé des courbes de dénaturation/renaturation thermique de notre ARN par mesure du signal de dichroïsme circulaire en l'absence et en présence de différents ratios molaires en nanobody afin de vérifier si l'interaction de ce dernier avec ϕ BC1-rib_{gImS} avait un effet quelconque sur la structure de l'ARN et/ou sur sa stabilité thermique.

4.8.1.2.1. Spectre de l'ARN ϕ BC1-rib_{gImS}

Dans un premier temps, nous avons réalisé un spectre CD complet de ϕ BC1-rib_{gImS} afin de déterminer son contenu en structures secondaires (**Figure 41**). Ce spectre CD a été établi sur une gamme de longueur d'onde de 200 à 360 nm et à une température de 25°C. L'ARN a été utilisé à une concentration de 500 nM dans une solution tampon HEPES 50 mM pH 7, NaCl 150 mM et MgCl₂ 10 mM.

Étant donné que le tampon utilisé est l'HEPES et que ce dernier absorbe de manière importante dans une gamme de longueurs d'onde inférieure à 220 nm, il est difficile d'observer des signaux importants et significatifs de notre ARN dans l'UV lointain. Cependant, nous constatons la présence d'un signal positif intense entre 260 et 280 nm caractéristique de la présence d'hélices d'ARN de pas droit plus communément dénommées « *hairpins* » [39]. Un autre signal positif est visible entre 210 et 220 nm, celui-ci indiquant la présence de duplexes d'ARN antiparallèles [40]. Ces deux signaux furent confirmés par un spectre réalisé dans une solution tampon TRIS (**Figure 42**).

Après avoir réalisé cette analyse du contenu en structures secondaires de ϕ BC1-rib_{gImS}, nous avons étudié l'influence de la liaison de notre nanobody sur le contenu en structures secondaires de notre ARN ϕ BC1-rib_{gImS}.

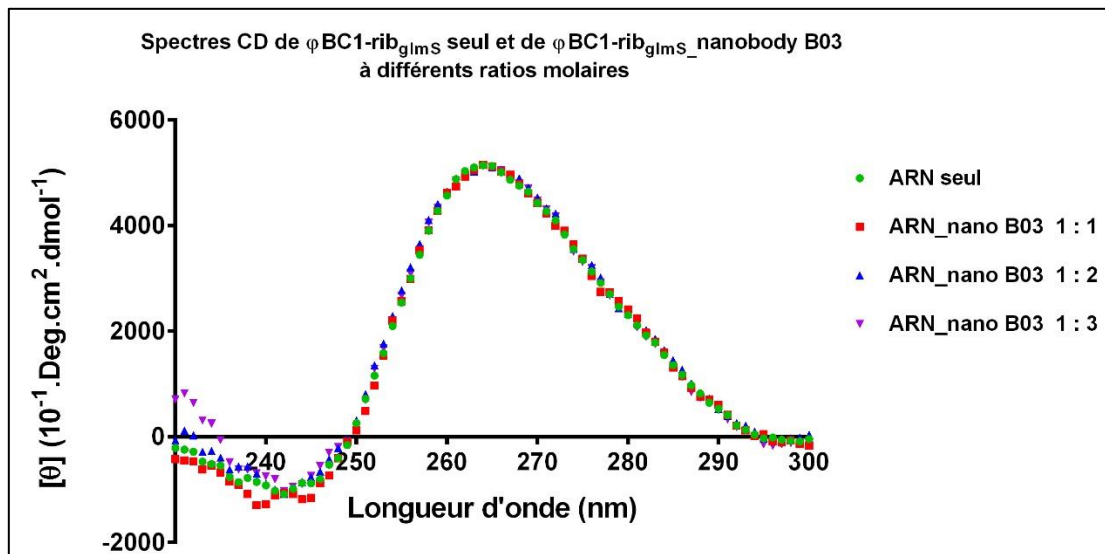


Figure 43 : Comparaison des spectres CD réalisés pour l'ARN seul (vert) et complexé au nanobody B03 dans différents ratios molaires : 1 : 1 (rouge), 1 : 2 (bleu) et 1 : 3 (mauve). La concentration en ARN utilisée est de 500 nM tandis que la concentration en nanobodies varie de 500 nM à 1,5 μ M en fonction du ratio molaire considéré. Le signal CD est exprimé en $10^{-1} \cdot \text{Deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ et celui-ci est représenté sur une gamme de longueur d'onde de 230 à 300 nm.

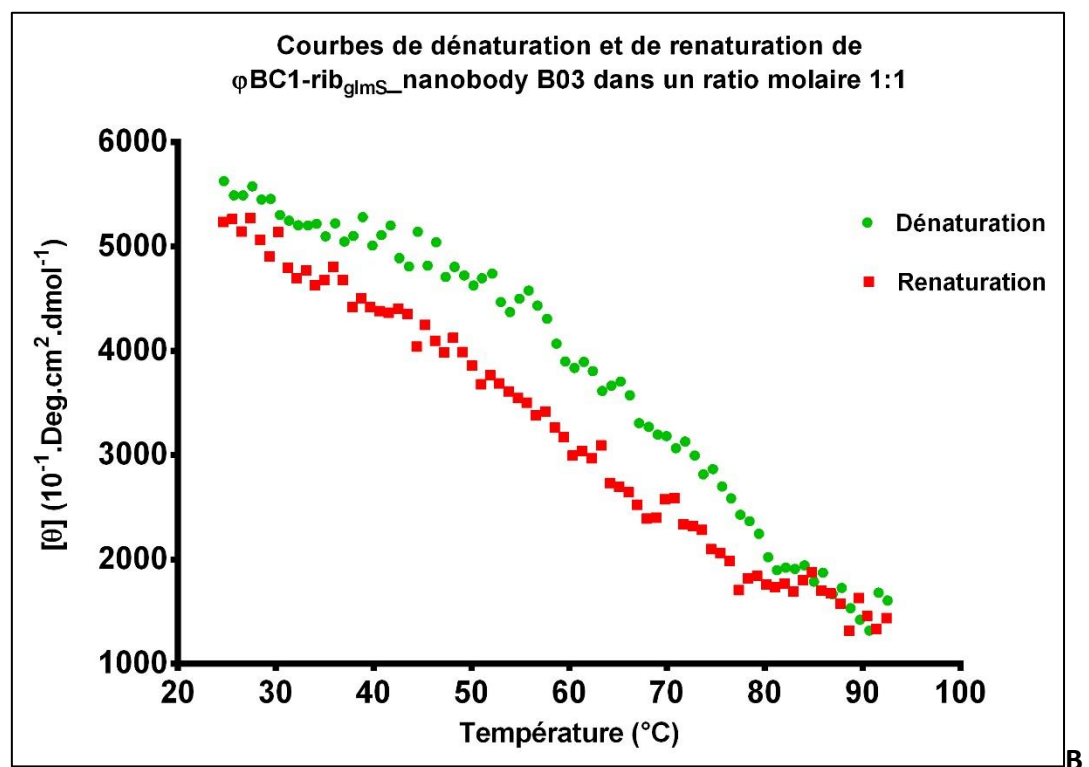
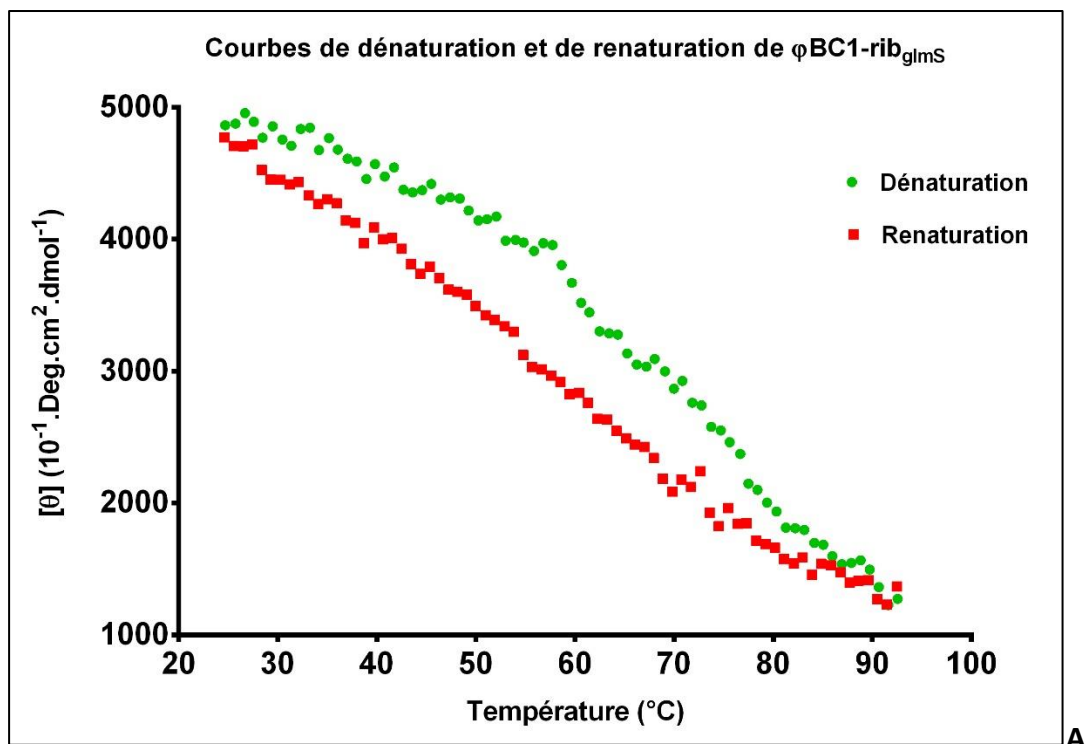
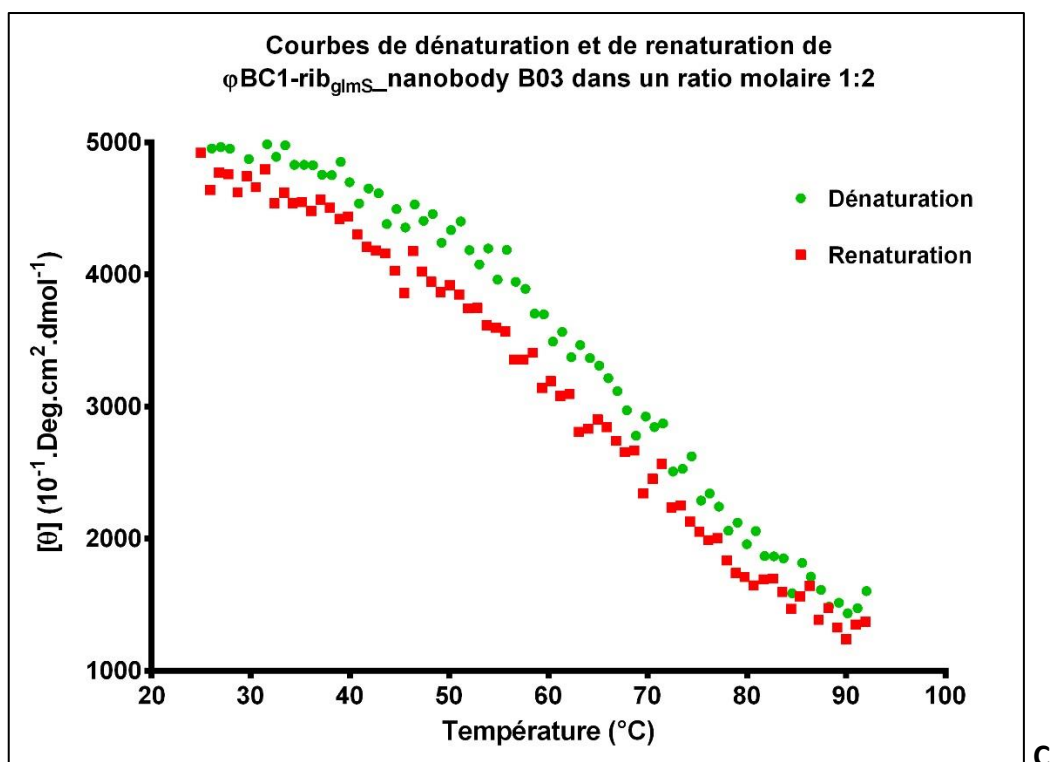
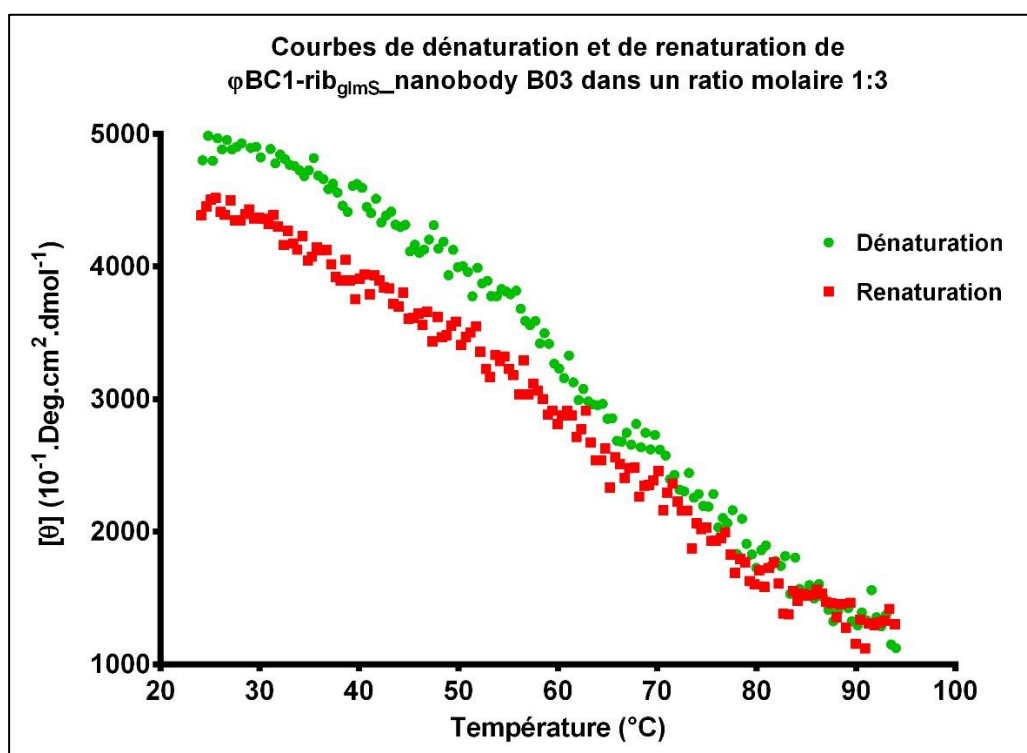


Figure 44 : Courbes de dénaturation (vert) et de renaturation (rouge) de ϕ BC1-rib_{glmS} seul (spectre A), ainsi que pour l'ARN complexé au nanobody B03 dans un ratio molaire 1 : 1 (spectre B). Ces courbes ont été mesurées à une longueur d'onde de 267 nm et sont exprimées en $10^{-1} \cdot \text{Deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ en fonction de la température ($^{\circ}\text{C}$).



C



D

Figure 44 : Courbes de dénaturation (vert) et de renaturation (rouge) de ϕ BC1-rib_{glnS} complexé au nanobody B03 dans un ratio molaire 1 : 2 (spectre C) et dans un ratio molaire 1 : 3 (spectre D). Ces courbes ont été mesurées à une longueur d'onde de 267 nm et sont exprimées en $10^{-1} \cdot \text{Deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ en fonction de la température (°C).

4.8.1.2.2. Comparaison des spectres CD de ϕ BC1-rib_{gls} seul et de l'ARN complexé en différents ratios molaires avec le nanobody B03

Nous avons réalisé une comparaison des spectres CD de ϕ BC1-rib_{gls} seul et complexé au nanobody B03 dans différents ratios molaires : 1 : 1, 1 : 2 et 1 : 3, afin de vérifier si le nanobody avait une quelconque influence sur le contenu en structures secondaires de l'ARN.

Étant donné la forte influence sur l'absorbance de l'HEPES à des longueurs d'onde inférieures à 220 nm, notre analyse s'est donc focalisée sur les signaux mesurés à des longueurs d'onde supérieures, à savoir le pic d'intensité positive compris entre 260 et 280 nm, qui correspond au contenu en *hairpins*. Comme nous pouvons le voir sur la **Figure 43**, les spectres de l'ARN seul et complexé à tous les ratios molaires sont totalement superposables.

Ces résultats suggèrent donc que le nanobody n'influence pas le contenu en structures secondaires de ϕ BC1-rib_{gls}.

4.8.1.2.3. Etude du comportement de dénaturation thermique de ϕ BC1-rib_{gls} seul ou complexé au nanobody B03 dans différents ratios molaires

Un point intéressant dans l'utilisation d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps comme protéine chaperonne, c'est l'effet stabilisant qu'il peut apporter par liaison avec son antigène. Cette propriété est particulièrement exploitée dans le cadre de la cristallographie, notamment, afin d'assurer une population plus homogène de l'échantillon [15].

Afin d'étudier l'effet du nanobody sur la stabilité thermique de ϕ BC1-rib_{gls}, des courbes de dénaturation et de renaturation ont été réalisées avec l'ARN seul (**Figure 44A**) et avec l'ARN complexé au nanobody B03 dans un ratio molaire 1 : 1 (**Figure 44B**), un ratio molaire 1 : 2 (**Figure 44C**) et un ratio molaire 1 : 3 (**Figure 44D**). Ces courbes ont été réalisées sur une gamme de température de 25 à 92 °C et suivies par mesure du signal CD à une longueur d'onde de 267 nm, puisque cette dernière présentait un signal positif d'intensité élevée et représentative du contenu en *hairpins* de l'ARN.

Dans un premier temps, contrairement à ce que nous avons observé dans le cadre de la dénaturation du nanobody B03, la dénaturation et la renaturation de l'ARN seul ne semblent pas suivre un système coopératif à deux états. En effet, nous ne retrouvons pas de transition nette entre une

	Tm* dénaturation	Tm* renaturation
ARN seul	70,7 ± 2,2°C	62,0 ± 4,0°C
ARN_nanobody (1 : 1)	70,3 ± 0,9°C	62,0 ± 4,2°C
ARN_nanobody (1 : 2)	68,6 ± 1,8°C	64,5 ± 0,4°C
ARN_nanobody (1 : 3)	64,8 ± 0,6°C	62,0 ± 0,4°C

Table 2 : Valeurs de Tm apparents (Tm*) de dénaturation et de renaturation de ϕ BC1-rib_{glims} seul et complexé au nanobody B03 dans différents ratios molaires. Le Tm* de l'ARN seul correspond à une moyenne calculée sur la base de 5 expériences menées de manière indépendante, tandis que les valeurs de Tm* des complexes illustrent une moyenne calculée sur bases de trois expériences menées également de manière indépendante.

forme native et une forme dénaturée, mais plutôt une dénaturation et une renaturation de l'ARN qui s'étalent sur une gamme assez large de température selon un modèle nommé « modèle de fermeture éclair ». Cet effet est à la fois visible pour l'ARN seul et pour les complexes formés aux différents ratios molaires.

De plus, nous observons également un décalage entre les courbes de dénaturation et celles de renaturation de ϕ BC1-rib_{gImS} seul. Ce décalage, nommé phénomène d'hystérésis, est assez bien caractérisé dans le cadre d'études réalisées sur des protéines [41]. Il est provoqué par une cinétique de dénaturation différente de la cinétique de renaturation de l'ARN, ce qui résulte en un décalage des deux courbes (**Figure 44A**). Ce phénomène est également présent pour le complexe ARN_nanobody à un ratio molaire 1 : 1 (**Figure 44B**). Cependant, on constate que ce phénomène diminue pour les complexes de ratio molaire 1 : 2 et 1 : 3 (**Figure 44C, 44D**). Cette observation suggère donc que notre nanobody influence le comportement de dénaturation et de renaturation de l'ARN.

De plus, nous avons mesuré des valeurs de T_m^* de dénaturation et de renaturation sur la base de ces courbes. Comme mentionné précédemment, les données expérimentales ont été ajustées à un modèle mathématique de type sigmoïdal faisant intervenir le coefficient de Hill (**Table 2**). Ces valeurs de T_m^* confirment et permettent de quantifier l'hystérésis observé pour l'ARN seul et pour le complexe de ratio molaire 1 : 1, ainsi que la diminution de ce phénomène pour les complexes de ratio molaire 1 : 2 et 1 : 3. Cependant, il est nécessaire de rester prudent quant à l'interprétation de ces résultats car les écarts-types sont assez importants, et ce principalement pour l'ARN seul et pour le complexe de ratio molaire 1 : 1. De même, l'analyse de ces valeurs indique que la liaison du nanobody ne semble pas augmenter la valeur de T_m^* de dénaturation et donc la stabilité thermique de ϕ BC1-rib_{gImS}. Au contraire, la liaison du nanobody aurait même tendance à diminuer le T_m^* de dénaturation de l'ARN.

L'ensemble de ces résultats indiquent donc que même si l'interaction du nanobody ne semble pas augmenter la stabilité thermique de ϕ BC1-rib_{gImS}, cette interaction génère un changement de comportement face à la dénaturation/renaturation thermique de l'ARN ϕ BC1-rib_{gImS}. Ce changement étant d'autant plus marqué que le ratio molaire est important, cela suggère que la stœchiométrie de l'interaction ϕ BC1-rib_{gImS} : B03 est supérieur à un modèle 1 : 1 et qu'au moins 3 nanobodies pourraient se fixer à une seule molécule d'ARN.

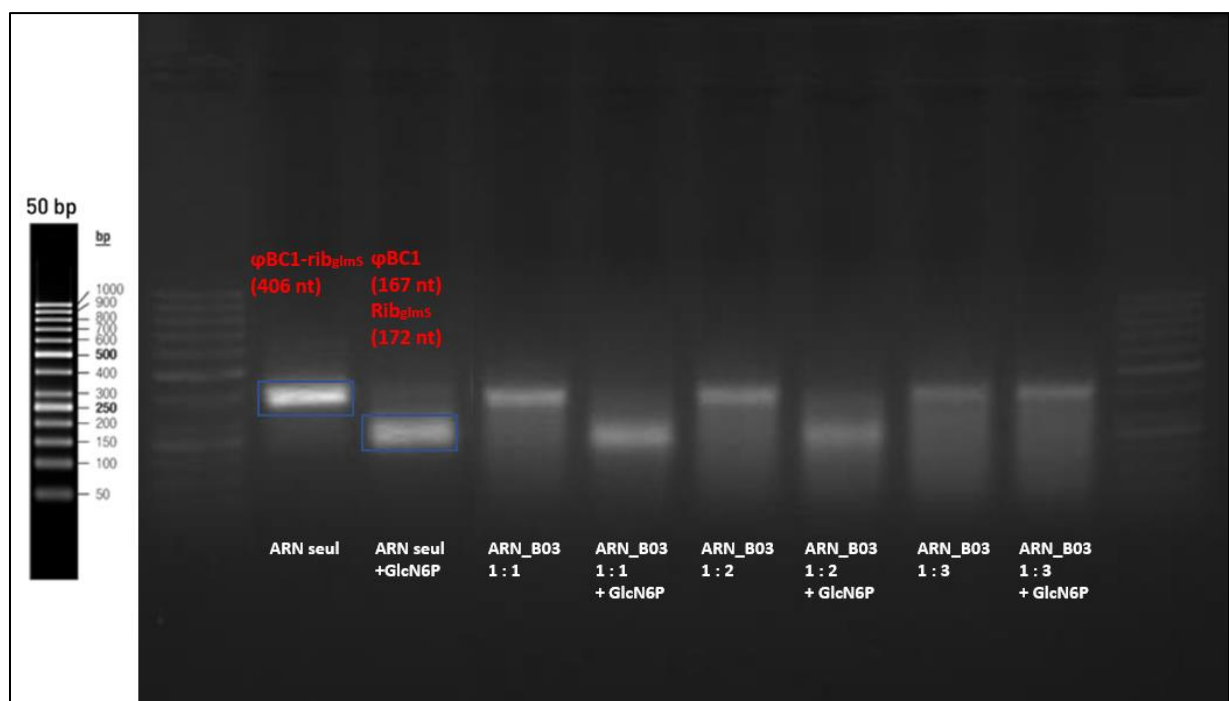


Figure 45 : Tests d'activité catalytique du ribozyme glmS pour l'ARN seul et complexé au nanobody B03 dans différents ratios molaires : 1 : 1, 1 : 2 et 1 : 3, après un cycle complet de dénaturation/renaturation thermique. Pour chaque ratio molaire, un échantillon est incubé en présence de GLCN6P et l'autre en l'absence de GLCN6P. Les encadrés en bleu mettent en évidence la fusion ϕ BC1-rib_{glmS} (406 nucléotides) qui migre moins rapidement, ainsi que les ARNs ϕ BC1 (167 nucléotides) et ribozyme glmS (172 nucléotides) migrant plus rapidement sur le gel agarose 2%. Cette expérience a été réalisée deux fois de manière indépendante.

4.8.2. Etude de la stabilité thermique de ϕ BC1-rib_{glmS} par test d'activité du ribozyme glmS

Afin de compléter l'étude de la stabilité thermique de ϕ BC1-rib_{glmS}, nous avons étudié la réversibilité de la dénaturation thermique de l'ARN seul et en complexe avec B03, dans différents ratios molaires, par mesure de l'activité biologique de l'ARN après un cycle complet de dénaturation/renaturation. La fusion de ϕ BC1 et du ribozyme glmS comporte un grand avantage dans la mesure où il nous est possible de vérifier l'intégrité de l'ARN par mesure de l'activité du ribozyme glmS.

Les mesures d'activité catalytiques ont été réalisées comme décrit dans la section matériel et méthodes au § 3.5.2. Après avoir réalisé des cycles de dénaturation et de renaturation entre 25 et 92°C, les ARNs fusions seuls, ou complexés au nanobody, ont été incubés à 37°C avec du glucosamine-6-phosphate, ce dernier correspondant au substrat du ribozyme glmS qui, grâce à ce dernier, permet le clivage de l'ARN fusion (406 nt) en ces constituants : ϕ BC1 (167 nt) et rib_{glmS} (172 nt). Par la suite, du DMSO est ajouté afin de stopper la réaction par déstructuration totale des ARNs sous une forme linéaire (simple-brin). Les produits de la réaction sont alors analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2 %.

Les résultats présentés à la **Figure 45** montrent que le ribozyme glmS est capable de cliver son lien avec ϕ BC1 en présence de GlcN6P, après un cycle de dénaturation/renaturation et ce, pour l'ARN seul ou complexé au nanobody, excepté dans le cadre d'un ratio molaire 1 : 3. Néanmoins, nous nous sommes rendu compte qu'il s'agissait d'un artéfact expérimentale, attribué à une concentration en Mg²⁺ inférieure dans cet échantillon (ratio 1 : 3) par rapport aux autres (ratio 1 : 1 ou ratio 1 : 2). Ce manque de magnésium a entraîné une déstructuration de l'ARN résultant en l'inactivation du ribozyme glmS.

Ces résultats nous permettent de conclure que l'ARN ϕ BC1-rib_{glmS} est capable de retrouver sa forme native après un cycle complet de dénaturation/renaturation thermique. De plus, la présence du nanobody ne semble pas interférer sur cette réversibilité.

Il est important de mentionner qu'une observation très intéressante ressort également de ces expériences. Sur tous les gels agaroses que nous avons réalisés, nous constatons que, plus le rapport ARN/nanobody augmente, et plus la bande correspondant au complexe est diffuse (« smear »). La présence de cette bande diffuse indique que l'ARN ne migre pas dans le gel sous forme linéaire (simple brin) mais au contraire, présente une certaine structure qui résiste à l'action du DMSO.

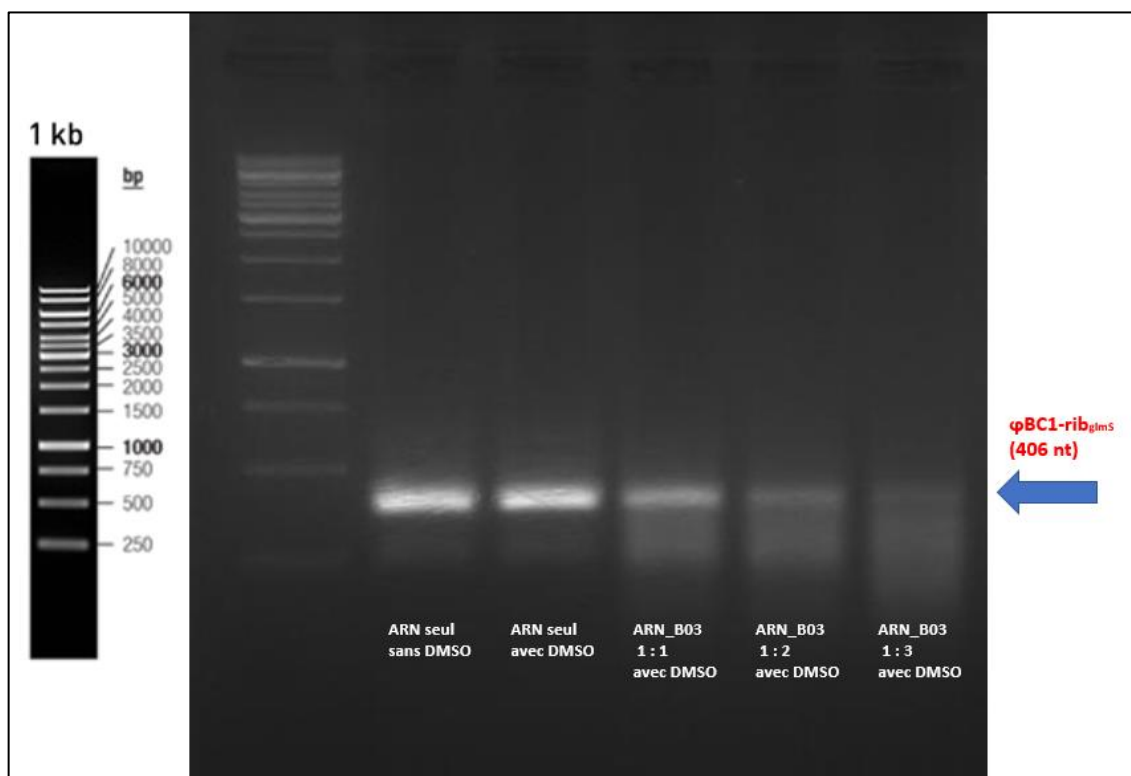


Figure 46 : Expérience d'électrophorèse sur gel d'agarose après traitement des échantillons au DMSO. Les mesures ont été réalisées pour l'ARN seul ou complexé au nanobody B03 dans différents ratios molaires : 1 : 1, 1 : 2 et 1 : 3. Un échantillon contrôle a également été réalisé pour ϕ BC1-rib_{glmS} sans traitement par le dénaturant chimique. La migration a été réalisée sur un gel agarose 2 %. La flèche en bleu indique la bande correspondant à notre ARN fusion d'une taille de 406 nucléotides.

4.9. Effet stabilisant du nanobody sur ϕ BC1-rib_{glnS} vis-à-vis de la dénaturation chimique

Au vu des résultats générés dans le cadre des mesures d'activité catalytiques présentées (ci-dessus), nous avons reproduit des électrophorèses sur gel d'agarose après traitement de l'ARN seul ou en complexe avec B03 par le DMSO, mais cette fois-ci sans mesure d'activité en présence de GLCN6P et sans cycle de dénaturation-renaturation thermique.

Dans cette expérience, l'ARN seul et les différents complexes ont été, dans un premier temps, incubés à 37°C pour rester dans les mêmes conditions que pour les tests d'activités, mais sans le GLCN6P. Par la suite, un traitement au DMSO a été réalisé, suivi de l'analyse des échantillons par électrophorèse sur un gel agarose 2 %.

Les résultats présentés à la **Figure 46** sont tout-à-fait semblables à ceux que nous avons observés dans le cadre des mesures d'activité biologique. En effet, nous constatons, de nouveau, une bande de moins en moins bien marquée (ARN complètement linéaire) lorsque nous augmentons le ratio molaire du complexe ARN/nanobody au profit de l'apparition d'une bande beaucoup plus diffuse, similaire à un « *smear* ». Même si, à l'heure actuelle, nous ne comprenons pas les bases moléculaires de cette observation, ces données suggèrent que l'interaction du nanobody à ϕ BC1-rib_{glnS} pourrait lui apporter une certaine protection vis-à-vis de la dénaturation chimique au DMSO.

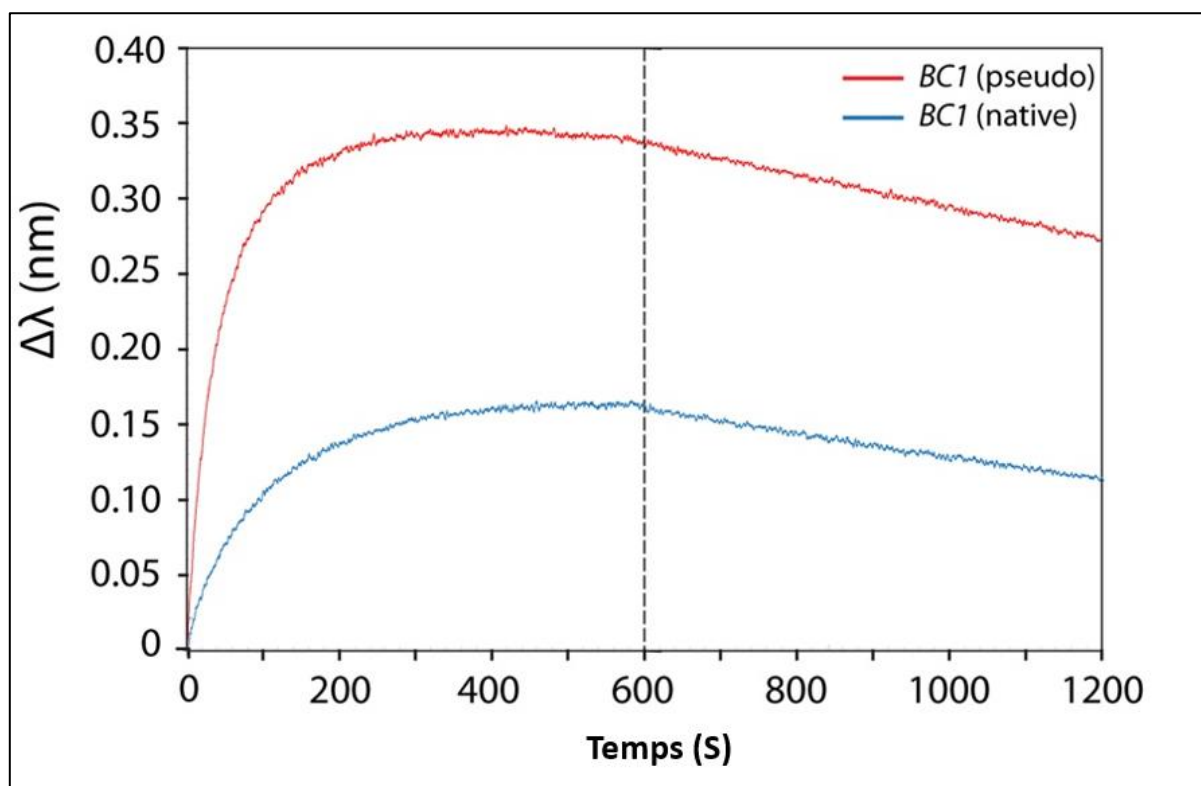


Figure 47 : Mesures d'interaction de $\phi BC1$ (rouge) et de $BC1$ (bleu) par interférométrie laser. Les cinétiques d'association et de dissociation ont été mesurées sur 600 secondes. Les concentrations utilisées sont de 100 nM pour les deux ARNs et de 58 nM pour la protéine.

5. Conclusions et perspectives

Le projet de recherche auquel j'ai pris part vise à développer des fragments d'anticorps dirigés contre des ARN_{st} formant ainsi de nouveaux outils d'études pour ces molécules encore très peu caractérisées. L'approche utilisée consistait à réaliser une librairie synthétique de fragments d'anticorps de camélidés par mutagenèse aléatoire de 11 résidus présents au niveau des CDRs et intervenant couramment dans des interactions de type ARN/protéine. Une sélection de cette librairie par *phage display* a, par la suite, été réalisée afin d'identifier les nanobodies montrant une forte affinité contre un ARN_{st} fusion ϕ BC1-rib_{glmS}. Cette sélection nous a permis d'obtenir deux nanobodies qui, par des tests ELISAs et par interférométrie laser (**Figure 25**), ont montré une certaine affinité pour l'ARN fusion. Ainsi, cette librairie, innovante et optimisée pour l'interaction avec l'ARN, est donc une approche efficace dans le cadre d'une sélection de protéines capables de lier l'ARN et d'autres acides nucléiques potentiels.

Dans un premier temps, nous avons tenté de produire et de purifier deux nanobodies (B03 et B90). Néanmoins, aucune expression de B90 n'a pas pu être détectée dans les conditions expérimentales utilisées. Etant donné le délai mis à ma disposition pour la réalisation de mon mémoire, nous nous sommes focalisés sur la caractérisation de B03. Les mesures d'interaction qualitatives réalisées par interférométrie laser ont montré une certaine spécificité du nanobody contre l'ARN_{st} (**Figure 33**) puisqu'aucune interaction n'a été observée pour l'ARN_{sb}, l'ADN_{sb}, l'ADN_{db}, l'ARN_{db} ou encore la BSA. Nos résultats ont également indiqué que le nanobody B03 interagit avec la partie ϕ BC1 de l'ARN fusion alors qu'aucune interaction n'a été mise en évidence pour le ribozyme glmS isolé. Néanmoins, la spécificité de cette protéine n'est pas strictement restreinte à ϕ BC1 (**Figure 34**) puisque B03 montre une interaction envers différents ARN_{st} testés. Cela peut s'expliquer notamment par le manque de diversité chimique au sein des ARNs et de manière plus générale au sein des acides nucléiques qui, comparé aux protéines (vingt acides aminés), comportent seulement quatre nucléotides. Le nombre de paratopes différents est donc nettement plus restreint pour l'ARN et, par conséquent, obtenir une forte spécificité envers un ARN cible est beaucoup plus difficile. Cependant, B03 présente une certaine capacité de discrimination au sein des ARN_{st} puisque qu'aucune interaction avec le ribozyme glmS n'a été observée. De même, des mesures d'interaction par interférométrie laser réalisées sur BC1 (la forme native et non le pseudogène) ont montré une interaction beaucoup plus faible avec le nanobody B03 par rapport à l'interaction observée entre le fragment d'anticorps et ϕ BC1 (**Figure 47**).

Ce résultat confirme que le nanobody B03 présente une certaine spécificité vis-à-vis des ARN_{st}. Néanmoins, il est évident que la spécificité de notre nanobody n'est pas optimale et est donc à améliorer.

Des mesures quantitatives d'interaction ont révélé une forte affinité de l'ordre du nM entre le nanobody B03 et ϕ BC1 (**Table 1**), aussi bien la forme isolée que dans le contexte de l'ARN fusion ϕ BC1- rib_{gImS} . Cette affinité, particulièrement forte, est un atout majeur dans la mesure où l'objectif principal de notre projet consiste à réaliser de la co-cristallisation d'un ARN_{st} avec un nanobody, avec tous les avantages dont nous avons déjà discuté au § 1.2.6. De plus, cette forte affinité est également intéressante dans le cadre d'étude fonctionnelle de l'ARN_{st} dans des modèles de cultures cellulaires (*in vitro*) et animales (*in vivo*). La détermination de constantes d'affinité a également été réalisée en présence d'EDTA (**Table 1**). Ce dernier déstructure la structure tridimensionnelle de nos ARNs par chélation des ions magnésium nécessaires à leur repliement [43], tout en conservant leur contenu en structures secondaires. L'augmentation importante de l'affinité (10 à 100X) de B03 en présence d'EDTA par rapport aux valeurs obtenues en présence d'ions magnésiums laisse supposer davantage une interaction avec une ou des structure(s) secondaire(s). Nous supposons que l'accessibilité de celle/ces dernière(s) est moins importante lorsque l'ARN possède sa structure 3D native que lorsque la structure de l'ARN est perdue (en présence d'EDTA), ce qui expliquerait cette augmentation d'affinité.

Jusqu'à présent, seuls deux travaux, présents dans la littérature, décrivent l'interaction entre un fragment d'anticorps (F_{ab}) et un ARN_{st} sur la base d'une structure 3D obtenue par co-cristallisation de l'ARN_{st} avec le F_{ab} . L'une de ces deux études met en évidence la reconnaissance d'un épitope structuré au niveau de l'ARN_{st} par un F_{ab} [17], tandis que l'autre démontre la reconnaissance d'un épitope davantage linéaire de l'ARN, celui-ci pouvant être utilisé comme un Tag [16]. Nous avons donc essayé d'identifier le type d'épitope reconnu par notre nanobody B03 : soit une séquence linéaire, soit un élément de structure secondaire commun aux différents ARNs reconnu par B03. Nous avons donc, dans un premier temps, réalisé un alignement de séquence de ces ARNs_{st}. Néanmoins, ce dernier n'a pas mis en évidence de séquence conservée entre ces différents ARNs, ce qui suggère que l'hypothèse d'un épitope linéaire n'était pas valable. Ensuite, plusieurs prédictions de structures secondaires ont alors été réalisées à partir du logiciel bio-informatique *RNAfold web server* sur les différents ARNs_{st} étudiés dans le cadre de ce travail. Nous avons d'abord testé la fiabilité de ce programme par comparaison de la prédiction de structures secondaires de BC1 établie par le programme et les structures secondaires de BC1 déterminées expérimentalement par tests enzymatiques et chimiques (**Annexe 10**) [19]. Cette comparaison a suggéré une très bonne fiabilité des prédictions de structures secondaires faites par le programme.

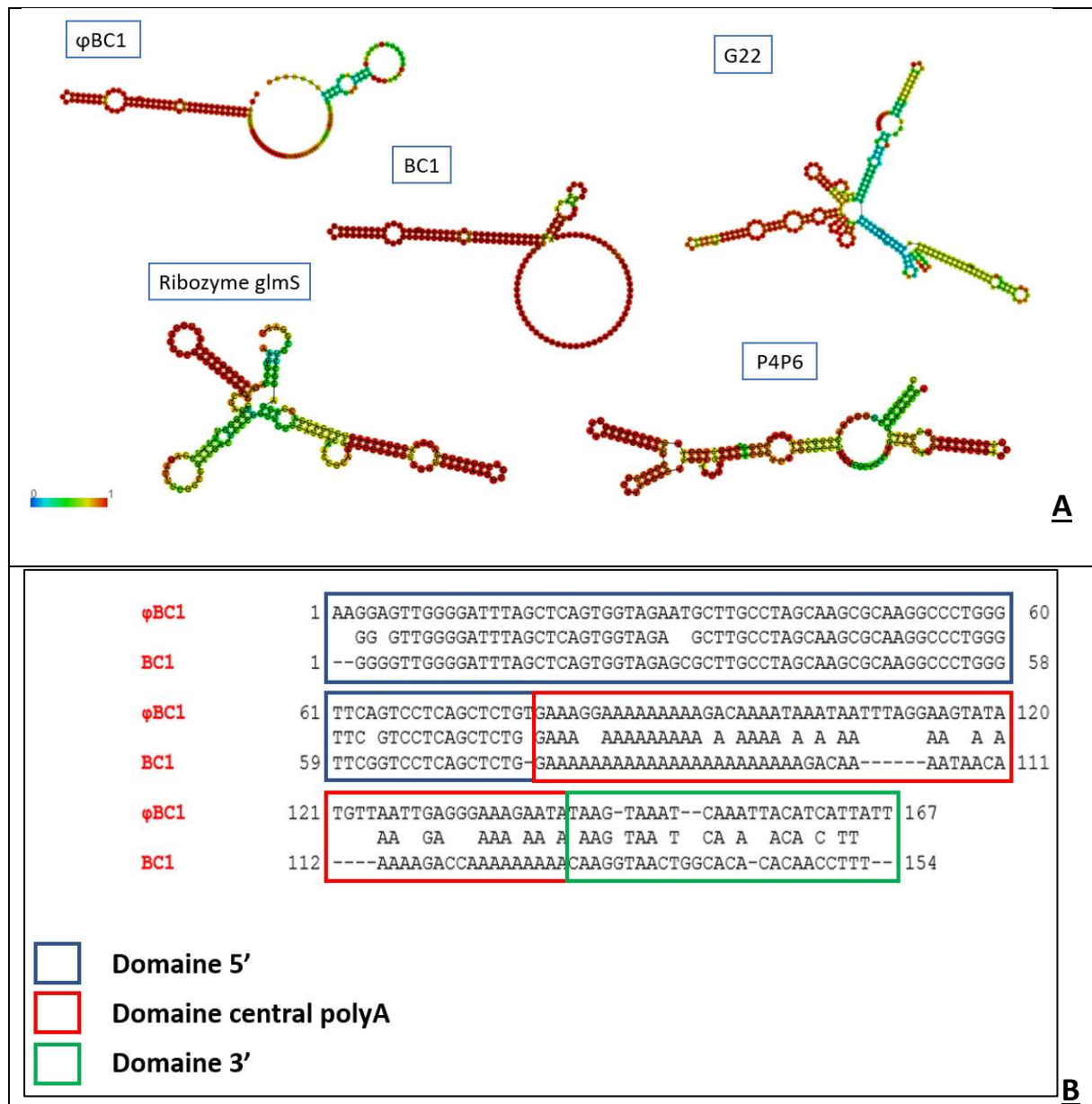


Figure 48 : (A) Analyse du contenu en structures secondaires des ARNs_{st} φBC1, BC1, G22, ribozyme glmS et P4P6 à partir du programme *RNAfold web server* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/NAWebSuite/RNAfold.cgi>). L'indice de confiance des structures secondaires présentées est évalué sur une échelle de 0 à 1 et présenté à l'aide d'un code couleur avec la couleur bleue pour la confiance la plus faible et la couleur rouge pour la confiance la plus élevée. Tous les ARNs_{st} testés contiennent des *hairpins* plus ou moins grandes, des *bulges* internes et des boucles externes. (B) Alignement de séquence de BC1 et de φBC1 avec un pourcentage d'identité de 72%. Ce dernier démontre un domaine 5' et un domaine central polyA avec une identité élevée tandis que le domaine 3' est nettement moins conservée.

Ainsi, plusieurs prédictions de structures secondaires des différents ARNs_{st} ont été réalisées. Cependant, les résultats obtenus n'ont pas permis de réellement mettre en évidence un/des élément(s) de structures secondaires présent(s) dans tous les ARNs_{st} qui interagiraient avec B03 (ϕ BC1, G22 et P4P6) et absents dans les ARNs_{st} non-reconnus par B03 (BC1 et ribozyme glmS) (**Figure 48**).

De plus, l'alignement des séquences nucléotidiques de BC1 et ϕ BC1 démontre une forte identité du domaine 5' ainsi que du domaine central polyA, tandis que le domaine 3' est fort différent. Cette différence est également visible sur la base de la prédiction de leur contenu en structures secondaires (**Figure 48**). De ce fait, nous pensons que l'interaction du nanobody B03 avec ϕ BC1 a lieu essentiellement au niveau du domaine 3', ce qui permettrait d'expliquer la différence d'interaction marquée avec BC1 et ϕ BC1 (**Figure 47**).

À l'heure actuelle, il est difficile de déterminer les bases moléculaires exactes de l'interaction entre le nanobody B03 et ϕ BC1-rib_{glmS}. Cette difficulté est d'autant plus grande que beaucoup de techniques mises en place dans le cadre de ce travail, comme le tamis moléculaire et l'ITC visant à déterminer une stœchiométrie de la réaction, ont été réalisées mais n'ont pas apporté de données expérimentales exploitables. Cependant, sur la base de l'ensemble des résultats générés dans ce travail, il est raisonnable de suggérer que la reconnaissance d'un élément de structure secondaire probablement très similaire à celui formant l'extrémité 3' de ϕ BC1 est responsable de l'interaction de notre nanobody à l'ARN_{st}.

Nous avons également démontré, par dichroïsme circulaire, que le nanobody, complexé à l'ARN dans des ratios molaires plus élevés que 1 : 1, était capable d'influencer les comportements de dénaturation et de renaturation de l'ARN en diminuant le phénomène d'hystérésis bien marqué pour l'ARN seul (**Figure 44**). Nous avons remarqué que ce dernier avait tendance à diminuer légèrement, mais de manière significative, le Tm* de dénaturation de l'ARN (**Table 2**). Par conséquent, la liaison du nanobody à l'ARN fusion n'induit pas une augmentation de la stabilité thermique de l'ARN. Néanmoins, elle confirme bien une réelle interaction entre les deux macromolécules. Il est également important de constater que le nanobody n'affecte pas le contenu en structures secondaires de l'ARN (**Figure 43**), ce qui est une caractéristique particulièrement intéressante dans le cadre de la co-cristallisation d'un anticorps avec un ARN d'intérêt.

De même, les expériences de traitement au DMSO suivies d'une analyse des échantillons par électrophorèses sur gels agaroses ont permis de mettre en évidence une observation très intéressante. Plus le ratio molaire nanobody/RNA augmente, plus la bande correspondant à l'ARN devient diffuse, ce qui suggère que l'ARN n'est plus linéaire (simple brin) mais présente une certaine structure conservée en présence de DMSO. Même si nous ne connaissons pas les bases moléculaires de cette

observation, ces résultats suggèrent que la liaison du nanobody apporterait une certaine stabilité l'ARN vis-à-vis de la dénaturation chimique (**Figure 46**).

Même si les bases moléculaires de l'interaction entre le nanobody B03 et l'ARN_{st} demeurent encore inconnues, ce travail a permis de mettre en évidence, pour la première fois, l'interaction entre un fragment d'anticorps de camélidé et un acide nucléique. Ces résultats sont à associer avec une stratégie expérimentale innovatrice fondée sur la sélection, par *phage display*, d'une librairie d'une part, synthétique, et d'autre part, enrichie en résidus préférentiellement retrouvés au sein des interfaces de complexes protéines-ARNs. Ainsi, cette stratégie se révèle être efficace dans le cadre du développement de fragments d'anticorps ciblant l'ARN_{st}. Néanmoins, elle doit être améliorée. En effet, dans le but d'augmenter le pouvoir de discrimination des *nbs* sélectionnés pour l'antigène cible, il serait intéressant de réaliser un nouveau criblage, par *phage display*, en introduisant durant la sélection des molécules compétitrices (ex : ARNs de transfert, héparine). De même, dans le cadre de notre projet, différents criblages pourraient être réalisés en parallèle en utilisant comme cible non pas la forme complète de BC1 mais, des « sections » de ce dernier définies en fonction de son contenu en structures secondaires (ex : domaine 3' ou domaine 5'). Aussi, afin de démontrer la multifonctionnalité de *nbs* ciblant l'ARN_{st}, on pourrait réaliser une sélection contre le ribozyme *glmS* isolé afin de sélectionner des nanobodies capables de se lier au niveau du site actif du ribozyme et de neutraliser son activité catalytique. Enfin, l'obtention de nanobodies spécifiques d'un ARN_{st} comme BC1, permettrait l'étude fonctionnelle de ce dernier soit dans un modèle de culture cellulaire (*in vitro*) soit dans un modèle animal (*in vivo*). Ces expériences donnent une idée des applications potentielles de *nbs* ciblant l'ARN_{st}. N'oublions pas également que la sélection réalisée dans le cadre de ce projet nous a permis d'obtenir deux clones, à savoir les clones B03 et B90. Par des optimisations de production et de purification, il serait également intéressant de caractériser l'interaction de B90 avec ϕ BC1-rib_{glmS} qui pourrait éventuellement montrer davantage de spécificité par rapport au nanobody B03.

Bibliographie

1. W. Yongzhong, F. Zhen, S. Lei, K. Xiaowei, H. Xianjuan, T. Dongrui, S. Ying, X. Yazhong, and Y. Li, (2016), "Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications", *International Journal of Nanomedicine*, vol. 11, pages 3287-3303.
2. D. Saerens, G. H. Ghassabeh, and S. Muyldermans, (2008), "Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics", *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 8, pages 600-608.
3. C. G. Siontorou, (2013), "Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy", *International Journal of Nanomedicine*, vol. 8, pages 4215-4227.
4. T. De Meyer, S. Muyldermans, and A. Depicker, (2014), "Nanobody-based products as research and diagnostic tools", *Trends in Biotechnology*, vol. 32 (5), pages 263-270.
5. S. Muyldermans, (2013), "Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies", *Annu. Rev. Biochem.*, vol 82, pages 775-797.
6. K. B. Vu, M. A. Ghahroudi, L. Wyns, and S. Muyldermans, (1997), "Comparison of Llama V_H Sequences from Conventional and Heavy Chain Antibodies", *Molecular Immunology*, vol 34 (16-17), pages 1121-1131.
7. S. Muyldermans, T. Atarhouch, J. Saldanha, J. A. R. G. Barbosa, and R. Hamers, (1994), "Sequence and structure of V_H domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains", *Protein Engineering*, vol. 7 (9), pages 1129-1135.

8. K. Deffar, H. Shi, L. Li, X. Wang, and X. Zhu, (2009), "Nanobodies – the new concept in antibody engineering", *African Journal of Biotechnology*, vol. 8 (12), pages 2645-2652.
9. J. Yan, P. Warig, M. Zhu, G. Li, E. Romao, S. Xiong, and Y. Wan, (2015), "Characterization and applications of Nanobodies against human procalcitonin selected from a novel naïve Nanobody phage display library, *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 13 (33), pages 1-11.
10. B. Virnekas, L. Ge, A. Pluckthun, K.C. Schneider, G. Wellnhofer, and S. E. Moroney, (1994), "Trinucleotide phosphoramidites : ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis", *Nucleic Acids Research*, vol. 22 (25), pages 5600-5607.
11. M. Treger, and E. Westhof, (2001), "Statistical analysis of atomic contacts at RNA–protein interfaces", *JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION*, vol. 14, pages 199-214.
12. J. X. Huang, S. L. Bishop-Hurley, and M. A. Cooper, (2012), "Development of Anti-Infectives Using Phage Display: Biological Agents against Bacteria, Viruses, and Parasites", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 56 (9), pages 4569-4582.
13. D. Saerens, G. H. Ghassabeh, and S. Muyldermans, (2008), "Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics", *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 8, pages 600-608.
14. T. De Meyer, S. Muyldermans, and A. Depicker, (2014), "Nanobody-based products as research and diagnostic tools", *Trends in Biotechnology*, vol. 32 (5), pages 263-270.

15. Shohei Koide, (2009), "Engineering of recombinant crystallization chaperones", *Curr Opin Struct Biol.*, vol. 19 (4), pages 449-457.
16. Y. Koldobskaya, E. M. Duguid, D. M. Shechner, N. B. Suslov, J. Ye, S. S. Sidhu, D. P. Bartel, S. Koide, A. A. Kossiakoff, and J. A. Piccirilli, (2011), "A portable RNA sequence whose recognition by a synthetic antibody facilitates structural determination", *Nat Struct Mol Biol.*, vol. 18 (1), 100-106.
17. J-D. Ye, V. Tereshko, J. K. Frederiksen, A. Koide, F. A. Fellouse, S. S. Sidhu, S. Koide, A. A. Kossiakoff, and J. A. Piccirilli, (2008), "Synthetic antibodies for specific recognition and crystallization of structured RNA", *PNAS*, vol. 105 (1), pages 82-87.
18. D. Lin, T. V. Pestova, C. U. T. Hellen, and H. Tiedge, (2008), "Translational Control by a Small RNA: Dendritic BC1 RNA Targets the Eukaryotic Initiation Factor 4A Helicase Mechanism", *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, vol. 28 (9), pages 3008-3019.
19. T. S. ROZHDESTVENSKY, A. M. KOPYLOV, J. BROSIUS, and A. HÜTTENHOFER, (2001), "Neuronal BC1 RNA structure: Evolutionary conversion of a tRNA^{Ala} domain into an extended stem-loop structure", *Cambridge University Press.*, vol. 7, pages 722-730.
20. T. Eom, I. A. Muslimov, P. Tsokas, V. Berardi, J. Zhong, T. C. Sacktor, and H. Tiedge, (2014), "Neuronal BC RNAs cooperate with eIF4B to mediate activity-dependent translational control", *J. Cell Biol.*, vol. 207 (2), pages 237-252.
21. J. A. Collins, I. Irnov, S. Baker, and W. C. Winkler, (2007), "Mechanism of mRNA destabilization by the glmS ribozyme", *GENES & DEVELOPMENT*, vol. 21, pages 3356-3368.

22. Adrian R. Ferré-D'Amaré, (2010), "The glmS ribozyme: use of a small molecule coenzyme by a gene-regulatory RNA", *J Phys Chem Lett.*, vol. 4 (1), pages 180-188.
23. J. T. Y. Kung, D. Colognori, and J. T. Lee, (2013), "Long Noncoding RNAs: Past, Present, and Future", *Genetics*, vol. 193, pages 651-669.
24. R. Li, H. Zhu, and Yunbo Luo, (2016), "Understanding the Functions of Long Non-Coding RNAs through Their Higher-Order Structures", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17 (5), pages 702-723.
25. P. Wu, X. Zuo, H. Deng, X. Liu, L. Liu, and A. Ji, (2013), "Roles of long noncoding RNAs in brain development, functional diversification and neurodegenerative diseases", *Brain Research Bulletin*, vol. 97, pages 69-80.
26. Nilay Chheda, and Manish K. Gupta, (2014), "RNA as a Permutation", arXiv:1403.5477v1.
27. E. Pardon, T. Laeremans, S. Triest, S. G. F. Rasmussen, Al. Wohlkönig, A. Ruf, S. Muyldermans, W. G. J. Hol, B. K. Kobilka, and J. Steyaert, (2014), "A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology", *nature protocols*, vol. 9, pages 674-693.
28. D. C. Krakauer, L. Muller, S. J. Prohaska, and P. F. Stadler, (2016), "Design Specifications for Cellular Regulation", *bioRxiv*, doi: <http://dx.doi.org/10.1101/081729>.

29. H. Block, B. Maertens, A. Spriestersbach, N. Brinker, J. Kubicek, R. Fabis, J. Labahn, and F. Schäfer, (2009), "Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review", *Methods in Enzymology*, vol. 463, pages 439-444.
30. N. NAKATANI, D. KOZAKI, M. MORI, and K. TANAKA, (2012), "Recent Progress and Applications of Ion-exclusion/Ion-exchange Chromatography for Simultaneous Determination of Inorganic Anions and Cations", *ANALYTICAL SCIENCES*, vol. 28, pages 845-852.
31. (2016), "Ion Exchange Chromatography, Principles and Methods", *GE Healthcare*, pages 11-25.
32. P. J. LUKAVSKY, and J. D. PUGLISI, (2004), "Large-scale preparation and purification of polyacrylamide-free RNA oligonucleotides", *RNA*, vol. 10, pages 889-893.
33. (2002), "Gel filtration, Principles and Methods", *Amersham Biosciences*, pages 5-29, Ed. 18-1022-18.
34. R. Tobias, S. Kumaraswamy, (2013), "Biomolecular Binding Kinetics Assays on the Octet Platform", *Pall ForteBio*, Application Note 14.
35. S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, (2005), "How to study proteins by circular dichroism", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1751 (2005), pages 119-139.
36. J. A. Jaeger, J. SantaLucia, and I. Tinoco, (1993), "DETERMINATION OF RNA STRUCTURE AND THERMODYNAMICS", *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 62, pages 255-87.

37. M. DUMOULIN, K. CONRATH, A. VAN MEIRHAEGHE, F. MEERSMAN, K. HEREMANS, L. G.J. FRENKEN, S. MUYLDERMANS, L. WYNS, AND A. MATAGNE, (2002), "Single-domain antibody fragments with high conformational stability", *Protein Science*, vol. 11, pages 500-515.
38. JoVE Science Education Database. Basic Methods in Cellular and Molecular Biology. The Western Blot. JoVE, Cambridge, MA, (2017).
39. M. J. E. Resendiz, A. Schön, E. Freire, and M. M. Greenberg, (2012), "Photochemical control of RNA structure by disrupting π -stacking", *J Am Chem Soc*, vol. 134 (30), pages 12478-12481.
40. M. Szabat, T. Pedzinski, T. Czapik, E. Kierzek, R.Kierzek, (2015), "Structural Aspects of the Antiparallel and Parallel Duplexes Formed by DNA, 2'-OMethyl RNA and RNA Oligonucleotides", *PLOS ONE*, vol. 10 (11), pages 1-16.
41. Benjamin T., Andrews, Dominique T. Capraro, Joanna I. Sulkowska, José N. Onuchic, and Patricia A. Jennings, (2013), "Hysteresis as a Marker for Complex, Overlapping Landscapes in Proteins", *J Phys Chem Lett.*, vol. 4 (1), pages 180-188.
42. I. Sela-Culang, V. Kunik, and Y. Ofran, (2013), "The structural basis of antibody-antigen recognition", *frontiers in IMMUNOLOGY*, vol. 4 (302), pages 1-13.
43. E. Westhof, and P. Auffinger, (2000), "RNA Tertiary Structure", *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (ED.), pages 5222-5232.

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

RESUME

Le dogme de la biologie a souvent considéré l'ARN comme un intermédiaire entre l'information génétique contenue dans l'ADN et la protéine qui assure les fonctions biologiques d'un organisme. Cependant, des études ont démontré que 70 % du génome des eucaryotes sont transcrits en ARNs mais seulement 2 % de ces transcrits sont traduits en protéines. Cette observation indique que 98 % des ARNs transcrits ne sont pas traduits en protéines et sont ainsi nommés ARNs non-codants (ARNs_{nc}). Ces derniers sont impliqués dans la régulation de nombreux processus biologiques, alors que leur dérégulation est associée à diverses pathologies. La majorité de ces transcrits adoptent une structure 3D complexe pour accomplir leur fonction biologique et sont ainsi nommés ARNs structurés (ARNs_{st}). Cependant, à l'heure actuelle, très peu d'ARNs_{st} ont été caractérisés ce qui reflète la complexité de ces molécules ainsi que le manque d'outils actuellement disponibles pour les étudier. Dans ce contexte, le développement de *nanobodies* (*nbs* : fragments d'anticorps de camélidés) dirigés contre ces ARNs_{st} vise à faciliter l'étude structurale et fonctionnelle de ces derniers. Préalablement à mon arrivée, une librairie synthétique de *nbs* a été générée et criblée par *phage display* contre un ARN qui consistait en la fusion de deux ARNs_{st} d'intérêt : i) *BC1* : un ARN_{st} exprimé dans les neurones et dont la structure est inconnue; ii) le ribozyme *glmS* (*rib_{glmS}*) : un ARN_{st} catalytique dont l'activité est caractérisée et facilement mesurable. L'intérêt d'une telle fusion est d'attester du bon repliement de l'ARN grâce à l'activité catalytique du ribozyme.

Dans le cadre de mon travail de fin d'étude, nous nous sommes focalisés sur la production, la purification et la caractérisation d'un des *nbs* sélectionnés lors du criblage de la librairie contre l'ARN fusion *BC1-rib_{glmS}*. Par interférométrie laser, nous avons démontré que ce *nb* lie la partie *BC1* de l'ARN fusion avec une forte affinité (de l'ordre du nM). Des mesures d'affinité réalisées en présence d'EDTA (qui déstabilise la structure 3D de l'ARN par chélation des ions Mg^{2+}) ont permis de déduire que ce *nb* interagit avec un élément de structure secondaire de l'ARN_{st}. Les résultats obtenus lors de l'étude de la spécificité du *nb*, indiquent qu'il est spécifique de l'ARN_{st} car il ne lie pas l'ARN_{sb}, l'ARN_{db}, l'ADN_{sb}, l'ADN_{db} ou la BSA. Néanmoins, une interaction entre le *nb* et différents ARNs_{st}, autres que *BC1*, a été observée. Nous supposons que ce *nb* reconnaît donc un/des élément(s) de structure(s) secondaire(s) communs aux différents ARNs_{st}.

Par des expériences de dichroïsme circulaire, nous avons démontré que la liaison du *nb* à l'ARN modifie son comportement de dénaturation et renaturation thermique. Enfin, nous avons également mis en évidence que la liaison du *nb* à l'ARN fusion est associée à une certaine protection de ce dernier vis-à-vis de la dénaturation chimique par traitement au Diméthyl Sulfoxyde (DMSO).

En conclusion, les résultats obtenus dans le cadre de ce travail valident l'approche expérimentale d'obtention de *nbs* dirigés contre l'ARN_{st} même si leur spécificité reste à optimiser.