

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand Frappier

Développement d'un circuit logique basé sur les ARN non codants dans les bactéries

Par

Sabrine Najeh

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en Microbiologie Appliquée

Jury d'évaluation :

Président du jury et examinateur interne : Dr. Etienne Yergeau - INRS-Institut
Armand Frappier

Examineur externe : Dr. Benoit Cousineau – département de microbiologie et
d'immunologie - McGill university

Directeur de recherche Dr. Jonathan Perreault - INRS-Institut Armand Frappier

Résumé

L'ARN est capable de se replier en structures secondaires et tertiaires par la formation des paires de base canoniques et non canoniques et ce repliement est important pour le bon fonctionnement des ARN régulateurs. Cela représente un défi pour les logiciels bioinformatiques qui font la conception des ARN synthétiques qui doivent conserver la structure et fonction de l'ARN original. Dans ce projet nous avons utilisé deux nouveaux outils bio-informatiques 'Ribosoft' et 'Enzymer'. L'un fait la conception des ribozymes en tête de marteau et l'autre permet la génération de nouveaux ARN de n'importe quel type. Le ribozyme en tête de marteau est un ARN noncodant auto-clivant actif en *cis* et en jouant sur sa séquence il peut être actif en *trans* pour cliver d'autres ARN d'une façon spécifique, il était utilisé dans ce projet pour développer un circuit logique qui permet le contrôle de l'expression d'un gène désiré. Le circuit est formé par des ribozymes sous le contrôle de *riboswitchs*. Les *riboswitchs* sont des ARN noncodants agissant comme des récepteurs capables de contrôler l'expression d'un gène situé en aval et leur activité est dépendante de la présence ou l'absence d'un ligand spécifique. Le rôle du *riboswitch* dans le circuit logique est le contrôle, via son ligand, de l'expression du ribozyme qui contrôle l'expression du gène cible.

RNA can fold into secondary and tertiary structures by the formation of canonical and non-canonical base pairs. This folding is important for the proper functioning of regulatory RNAs. This represents a challenge for bioinformatic softwares for the design of synthetic RNA that must maintain the structure and function of the original RNA. In this project, we used two new bioinformatics tools 'Ribosoft' and 'Enzymer', the first can design new hammerhead ribozymes and the other allows the generation of new RNAs of any type. The hammerhead ribozyme is a non-coding RNA with a self-cleaving activity in *cis*, but by modifying its sequence it can be made to act in *Trans* to cleave other RNAs in a specific way. The ribozyme was used in this project to develop a logic circuit that enables the control of the expression of a desired gene. The circuit is formed by riboswitches in addition to ribozymes. Riboswitches are allosteric non-coding RNAs capable of controlling the expression of a gene located upstream of them and their activity is dependent on the presence or absence of a specific ligand. The role of the riboswitch in the logic circuit is the control, via its ligand, of the expression of the ribozyme that controls the expression of the target gene.

REMERCIEMENTS

Je consacre cette page pour montrer ma reconnaissance et gratitude à toute personne qui m'a aidée de près ou de loin afin de réaliser mon projet et mon mémoire de maîtrise particulièrement :

Mon directeur de recherche Pr. Jonathan Perreault pour l'aide et le support qu'il a montré tout au long des deux ans de ma maîtrise et même avant mon arrivé au Canada.

Les professeurs Etienne Yergeau et Benoit Cousineau d'avoir accepté de consacrer une partie de leur temps pour examiner mon mémoire.

La Fondation Armand Frappier pour m'avoir octroyée une bourse d'excellence.

DEDICACE

Je dédie ce travail à mes chers parents Fatma et Ali qui ont toujours cru en moi et m'ont supportée malgré tout dans tous les choix que j'ai faite dans ma vie.

Mes sœurs Ahlem, Fadhila et Imen qui sont ma source d'inspiration et qui étaient toujours là pour me supporter.

Mes frères Fadhel, Ayoub et Chokri pour leur amour et soutien.

Mes meilleurs amis Arafet, Achraf, Anas, Nahla, Chadlia, Asma et Ines pour avoir été une source de bonheur et avec qui j'ai partagé les meilleurs souvenirs.

Tous les membres de mon laboratoire spécialement Amal, Fatma et Roqaya qui ont créé une très belle ambiance de travail et qui sont devenue ma deuxième famille à l'étranger.

Enfin à ma grande famille, particulièrement mes cousines Amal, Sonia et Abir et à tous ceux et celles que j'aime bien et que je n'ai pas mentionné leurs noms.

Table des matières

1	INTRODUCTION :	12
1.1.	LES ACIDES NUCLEIQUES :	12
1.1.1.	<i>L'acide désoxyribonucléique (ADN):</i>	12
1.1.2.	<i>Les acides ribonucléiques (ARN):</i>	13
1.2.	LES RIBOZYMES :	14
1.3.	RIBOZYMES EN TETE DE MARTEAUX :	16
1.3.1.	<i>Découverte :</i>	16
1.3.2.	<i>Distribution chez les êtres vivants :</i>	16
1.3.3.	<i>Les types de structure de ribozyme en tête de marteau :</i>	17
1.3.4.	<i>Dépendance du ribozyme en tête de marteau en ions divalents :</i>	19
1.3.5.	<i>Types de ribozyme en tête de marteau :</i>	20
1.3.6.	<i>Mécanisme d'action :</i>	21
1.3.7.	<i>Utilisation du ribozyme en tête de marteau :</i>	22
1.4.	RIBOSWITCHS :	23
1.4.1.	<i>Définition et historique :</i>	23
1.4.2.	<i>Mécanismes d'action :</i>	25
1.4.3.	<i>Mécanisme d'action chez les eucaryotes :</i>	30
1.4.4.	<i>Riboswitch SAM :</i>	31
1.4.5.	<i>Riboswitch Lysine :</i>	33
1.4.6.	<i>Génération de nouveaux riboswitchs :</i>	34
1.5.	CIRCUIT LOGIQUE :	35
1.5.1.	<i>Les fonctions logiques :</i>	35
1.5.2.	<i>Les portes logiques (logic gates) :</i>	39
1.5.3.	<i>Application de la logique en biologie</i>	39
1.5.4.	<i>Application des fonctions logiques en biologie :</i>	42
1.6.	CONCEPTION DES ARN SYNTHETIQUES :	42
1.6.1.	<i>Les difficultés liées à la conception :</i>	42
1.6.2.	<i>Ribosoft :</i>	43
1.6.3.	<i>Enzymer :</i>	47
2	PROBLÉMATIQUES, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS :	50
3	MATERIELS ET METHODES :	53
3.1.	LES RIBOZYMES CONÇUS PAR RIBOSOFT :	55
3.1.1.	<i>Amplification des ribozymes et de leurs cibles :</i>	56
3.1.2.	<i>Transcription des produits des PCR :</i>	61
3.1.3.	<i>Clivage de RFP par les ribozymes :</i>	63
3.1.4.	<i>Suivi de la cinétique des ribozymes :</i>	63
3.1.5.	<i>Amplification de l'ADN des riboswitchs et du terminateur par PCR :</i>	63
3.1.6.	<i>Test de l'ensemble ribozyme + riboswitch + terminateur :</i>	66
3.1.7.	<i>Valider l'opération XOR :</i>	66
3.1.8.	<i>Les tests in vivo :</i>	69
3.2.	PARTIE ENZYMER :	73
3.2.1.	<i>Amplification des ribozymes</i>	73
3.2.2.	<i>Transcription in vitro :</i>	75
3.2.3.	<i>Test de l'activité des ribozymes in vivo :</i>	76
4	RESULTATS :	81

4.1. VALIDATION DE RIBOSOFT :	81
4.1.1. <i>Activité des ribozymes synthétiques :</i>	81
4.1.2. <i>Cinétique des ribozymes :</i>	84
4.1.3. <i>Spécificité des ribozymes conçus par Ribosoft :</i>	86
4.2. L'UTILISATION DES RIBOZYMES DANS DES OPERATIONS LOGIQUES :	87
4.2.1. <i>L'opération logique XOR :</i>	87
4.2.2. <i>Effet de l'ajout de la séquence du riboswitch devant le ribozyme in vitro :</i>	88
4.3. ACTIVITE DES RIBOZYMES IN VIVO :	89
4.4. PARTIE ENZYMER	90
4.4.1. <i>Test in vitro des ribozymes en tête de marteau :</i>	90
4.4.2. <i>Test in vitro des ribozymes GImS :</i>	92
4.4.3. <i>Séquence avec deux niveaux d'information : codante et catalytique :</i>	92
5 DISCUSSION	96
5.1. PARTIE RIBOSOFT :	96
5.1.1. <i>Activité des ribozymes in vitro :</i>	96
5.1.2. <i>La combinaison :</i>	97
5.1.3. <i>Cinétique des ribozymes :</i>	99
5.1.4. <i>La spécificité des ribozymes conçus par Ribosoft :</i>	99
5.1.5. <i>L'activité des ribozymes in vivo</i>	100
5.1.6. <i>Ribosoft en comparaison avec les autres outils de conception de ribozymes</i>	101
5.2. L'UTILISATION DES RIBOZYMES DANS DES OPERATIONS LOGIQUES :	104
5.2.1. <i>L'effet de l'ajout de la séquence du riboswitch devant le ribozyme in vitro :</i>	104
5.2.2. <i>L'opération XOR :</i>	105
5.3. PARTIE ENZYMER :	107
5.3.1. <i>Activité des ribozymes in vitro :</i>	107
5.3.2. <i>Activité des ribozymes in vivo :</i>	108
6 CONCLUSION ET PERSPECTIVES :	109
7 REFERENCES :	112

La liste des figures :

Figure 1.1 : Structure de l'adn.....	13
Figure 1.2: Introns de groupe I.....	15
Figure 1.3: Structure d'un ribozyme minimal.....	17
Figure 1.4: Réaction de transestérification.....	18
Figure 1.5: Structure d'un ribozyme en tête de marteau complet.....	19
Figure 1.6: Les types de ribozyme en tête de marteau.....	20
Figure 1.7: Réplication circulaire et rôle du ribozyme en tête de marteau.....	21
Figure 1.8: Les états du site actif du ribozyme en tête de marteau.....	22
Figure 1.9 : Ribozyme en tête de marteau actif en trans.....	23
Figure 1.10: Structure d'un riboswitch.....	24
Figure 1.11: Mécanisme d'action des riboswitchs au niveau de la transcription et la traduction.....	27
Figure 1.12: Mécanisme d'action du riboswitch GImS.....	28
Figure 1.13: Mécanisme d'action du riboswitch au niveau de l'épissage.....	28
Figure 1.14: Stratégie anti-sens du riboswitch SAM.....	29
Figure 1.15: Structure des aptamères du riboswitch de la glycine.....	30
Figure 1.16 : Mécanisme d'action du riboswitch de TPP chez les eucaryotes.....	31
Figure 1.17 : Les aptamères des différentes classes des riboswitchs SAM.....	32
Figure 1.18: Structure de l'aptamère du riboswitch Lysine.....	33
Figure 1.19: Schéma explicatif des étapes de SELEX.....	35
Figure 1.20: Représentation de la fonction ET.....	36
Figure 1.21: Représentation de la fonction OU.....	36
Figure 1.22: Représentation de la fonction NON.....	37
Figure 1.23: Représentation de la fonction NON-ET.....	37
Figure 1.24: Représentation de la fonction NON-OU.....	38
Figure 1.25: Représentation de la fonction XOR.....	38
Figure 1.26: Représentation de la fonction X-NOR.....	39
Figure 1.27: Structure d'un ribozyme allostérique.....	41
Figure 1.28: Structure d'un anti-switch.....	42
Figure 1.29: Structure secondaire du ribozyme en tête de marteau.....	44
Figure 1.30: Première étape pour Ribosoft.....	45
Figure 1.31: Deuxième étape.....	46
Figure 1.32: Troisième étape : résumé des conditions de l'expérimentation.....	46
Figure 1.33: Résultats donnés par Ribosoft.....	47
Figure 1.34: Etapes de conception par enzymen.....	49
Figure 3.1 : circuit logique formée d'ARN.....	53
Figure 3.2 : Le circuit logique en présence d'un seul ligand.....	54
Figure 3.3 : Le circuit en présence des deux ligands.....	55
Figure 3.4: plasmide pSB1C3 BBa_1010.....	58
Figure 3.5 : La séquence du RFP.....	59
Figure 3.6 : L'ADN de RFP avec les sites de clivage ciblé par les ribozymes.....	59
Figure 3.7 : Séquence de la portion du 16S.....	60
Figure 3.8 : La portion de l'ADN 16S avec les sites de clivage.....	60
Figure 3.9: PCR d'assemblage.....	65
Figure 3.10: Hybridation des ribozymes XOR.....	67
Figure 3.11 : complémentarité entre le ribozyme XOR A et le ribozyme XOR B.....	67
Figure 3.12: Le plasmide pSEVA3b67Rb. (Addgene).....	71
Figure 3.13: Structure secondaire d'un ribozyme en tête de marteau de type I (dans le métagénome de la souris).....	73
Figure 3.14 : Ribozyme utilisé pour les tests in vivo de 'Enzymer'.....	77
Figure 3.15 : Séquence du ribozyme Hh00.....	77
Figure 3.16: Structure secondaire du ribozyme en tête de marteau de type I (dans le génome de <i>Yarrowia lipolitica</i>).....	78

Figure 3.17: Plasmide pUC57 avec la séquence de RFP et le ribozyme.....	79
Figure 4.1: Test des ribozymes conçus par Ribosoft sur l'ARNm de RFP.....	82
Figure 4.2: Test des ribozymes conçus pour la portion de l'ARN 16S.....	84
Figure 4.3 : Suivi de la cinétique des ribozymes 9(1) et 9(7).	85
Figure 4.4: Test de la spécificité des ribozymes.....	86
Figure 4.5: Validation de l'opération XOR.....	87
Figure 4.6: L'effet de l'ajout des riboswitchs aux ribozymes.	89
Figure 4.7 : Mesure de la fluorescence émise par les bactéries E. coli BL21 DE3.....	90
Figure 4.8: Test de l'activité des ribozymes en tête de marteau conçus par Enzymer.....	91
Figure 4.9: Test de l'activité des ribozymes GlmS.....	92
Figure 4.10 : Structure secondaire du ribozyme incluant la séquence codante.	93
Figure 4.11: Mesure de la fluorescence émise par les bactéries après transformation.	94
Figure 5.1: Le test des ribozymes conçus par Ribosoft contre le PABPN1.....	98
Figure 5.2: Cinétique des ribozymes conçus contre le gène PABPN1.....	99
Figure 5.3: Le test des ribozymes contre le gène PABPN1 in vivo.....	101
Figure 5.4: Capture d'écran du 'Ribosubstrate'.....	102
Figure 5.5: Capture d'écran de l'étape d'entrée de l'ARN cible sur Aladdin.....	103
Figure 5.6: Capture d'écran de la page des résultats généré par Aladdin.....	104
Figure 5.7: Le circuit logique construit pour répondre à la fonction XOR.....	106
Figure 5.8: Un circuit logique construit par l'ADN pour valider l'opération XOR.....	106

Liste des tableaux :

Tableau 1: Distribution des ribozymes en tête de marteau chez les procaryotes tiré de (Hammann et al., 2012).....	16
Tableau 2 : Table de vérité de la fonction ET	36
Tableau 3 Table de vérité de la fonction OU	36
Tableau 4 : Table de vérité de la fonction NON	37
Tableau 5 : Table de vérité de la fonction NON-ET	37
Tableau 6 : Table de vérité de la fonction NON-OU	38
Tableau 7 : Table de vérité de la fonction XOR	38
Tableau 8 : Table de vérité de la fonction X-NOR	39
Tableau 9: Séquences des ribozymes testés contre RFP	56
Tableau 10 : Séquences des ribozymes testés contre la portion de l'ARN 16S	57
Tableau 11 : Séquences des amorces pour amplifier l'ADN du RFP	59
Tableau 12 : Construction pour le test de spécificité.	60
Tableau 13: Construction des ribozymes contrôlés par des riboswitchs	64
Tableau 14 : Construction des ribozymes pour l'opération XOR.....	68
Tableau 15 : Construction pour les essais in vivo.....	70
Tableau 16 : Séquences des amorces du plasmide pSEVA3b67Rb	73
Tableau 17 : Séquences des ribozymes en tête de marteau générés par Enzymer.	74
Tableau 18 : Ribozymes GImS	75
Tableau 19 : Construction des ribozymes HH05.....	78
Tableau 20 : Comparaison des données expérimentales avec les paramètres de Ribosoft (Kharma et al., 2016).....	97

Liste des abréviations :

³²P : radioisotope du phosphore

A : Adénine

AEC : Antimetabolite Compound

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AdoCbl : AdénosylCobalamine

APS : Ammonium PerSulfate

ARN : Acide RiboNucléique

ARNr : ARN ribosomal

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine TriPhosphate

BSA : Bovin Serum Albumine

C : Cytidine

c-di-GMP : di-Guanosine MonoPhosphate cyclique

CRISPR : Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

FLC : Full Length Circularization

G : Guanine

GlcN6P : Glucosamine-6-Phosphate

GTP : Guanosine TriPhosphate

HCV : Virus de l'Hépatite C

HIV : Virus d'Immunodéficience Humaine

IGEPAL-CA 630 : Octylphenoxy polyethoxyethanol

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

K_d : constante de dissociation

K_m : constante de Michaelis

LB : Luria Broth

RBS : Site de liaison du Ribosome

RFP : Red Fluorescent Protein

RPM : Rotation Par Minute

SAM : S-AdénosylMéthionine

SD : Shine Dalgarno

SELEX : Systemic Evolution of Ligand by Exponential enrichment

SINE : Short Interspersed Nuclear Elements

siARN : petit ARN interférent

snoARN : petit ARN nucléolaire

SOC : Super Optimal Broth

TAE : Tris Acétate EDTA

TBE : Tris Borate EDTA

TEMED : TEtraMéthylEthyléneDiamine

TPP : Thiamine pyrophosphate

U : Uridine

UTR : Untranslated Region

1 INTRODUCTION :

Les fonctions permettant à une cellule d'être vivante sont le résultat de l'expression des gènes générés par un ensemble de réactions biochimiques passant par la réplication de l'acide désoxyribonucléique et la transcription jusqu'à la traduction en protéines. Ces réactions ont besoin d'être régulées tout au long du processus d'expression en incluant plusieurs régulateurs. En fait, l'expression des gènes est l'une des clés de la continuité de la vie d'une cellule. C'est pour cette raison que plusieurs études en biologie ont pour but de permettre de réguler et contrôler ce processus.

La perturbation soit de la réplication de l'ADN, de la transcription ou de la traduction résultant d'une mutation cause généralement des maladies graves comme le cancer ou les atrophies musculaires donc le but de plusieurs études en biologie est de mieux comprendre ces problèmes et trouver une façon de les régler.

1.1. Les acides nucléiques :

Ce sont les biomolécules de base contenant l'information génétique dans les cellules vivantes et sont responsables de leur fonctionnement. Deux types d'acides nucléiques, l'ADN et l'ARN (l'acide ribonucléique) étaient décrits pour la première fois par Friedrich Miescher en 1868. (Dahm, 2005)

1.1.1. L'acide désoxyribonucléique (ADN):

L'ADN est la molécule porteuse de l'information génétique, c'est un polymère de nucléotides reliés par des liaisons phosphodiesters, et représente l'unité de base de l'ADN. Chaque nucléotide est formé par un sucre, le désoxyribose, une base azotée qui peut être ; guanine, cytosine, adénine ou thymine (G, C, A, T) et un groupement phosphate. Il forme une double hélice grâce à la formation des liaisons hydrogènes entre les bases azotées où le A se lie à T par deux liaisons et le G se lie à C par trois liaisons électrostatiques selon le modèle de Watson et Crick qui ont identifié la structure de l'ADN pour la première fois (Watson, 1953) (Figure 1.1).

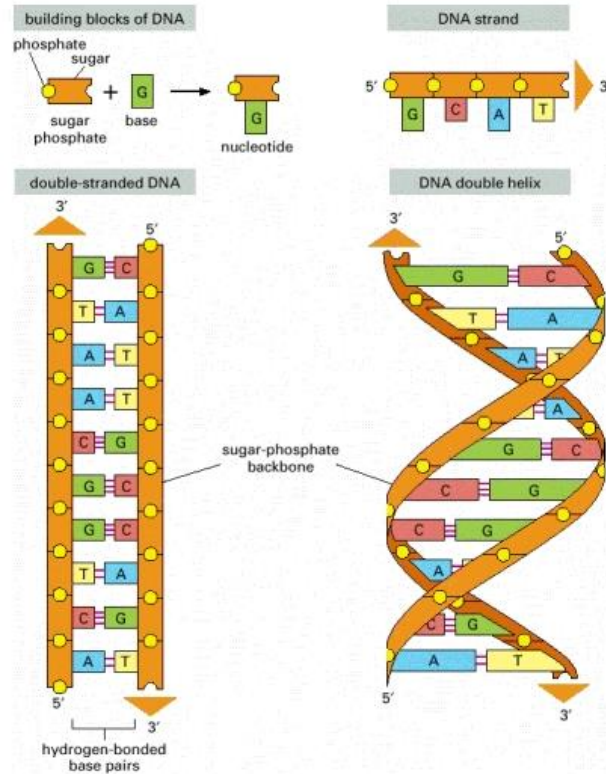


Figure 1.1 : Structure de l'ADN.

Les liaisons hydrogènes formées entre les acides nucléiques de l'ADN lui donne sa structure en double hélice. Le groupement phosphate lié à un sucre et une base azoté forme un nucléotide et plusieurs nucléotides liés par des liaisons covalentes forment un brin d'ADN. Tiré de (Alberts B, 2002).

1.1.2. Les acides ribonucléiques (ARN):

L'ARN est une molécule issue de la transcription de l'ADN. En fait, c'est une copie de ce dernier, mais avec quelques différences. Les nucléotides de l'ARN contiennent un ribose au lieu du désoxyribose et une base azotée uracile à la place de la thymine. Aussi, bien que l'ARN forme des structures secondaires contenant des parties double brin, il n'est pas entièrement double brin.

Lorsque l'ARN est transcrit à partir de l'ADN, il peut soit donner naissance à des protéines soit agir dans la cellule sous sa propre forme ; et ceci dépend du type de l'ARN : codant ou noncodant.(Alberts B, 2002)

- **Les ARN codants :**

Ces ARN sont définis comme messagers, et doivent cette dénomination au fait qu'ils jouent ce rôle entre l'ADN et les protéines par le biais de la lecture de cet ARN par le ribosome. En effet, dans la séquence de l'ARNm encodant la protéine chaque triplet de nucléotide représente un codon reconnu par un ARN de transfert (ARNt) portant l'acide aminé qui doit

être ajouté à la chaîne peptidique synthétisée. Les ARN codants occupent la plus grande partie du génome chez les bactéries, mais chez les eucaryotes ils ne représentent qu'un faible pourcentage par rapport aux ARN noncodants (Mattick & Makunin, 2006).

Lorsqu'un seul ARNm code pour une seule protéine c'est un ARN monocistronique et lorsqu'il code pour plusieurs protéines il est nommé polycistronique.

- **Les ARN noncodants :**

Comme leur nom l'indique, ce sont les ARN (ou des régions d'ARN) qui ne codent pas pour des protéines, mais ont d'autres fonctions. Il a été démontré qu'ils représentent la partie majoritaire des ARN transcrits des génomes de plusieurs organismes parmi lesquels les mammifères. Ils sont généralement situés dans les régions intergéniques, les régions non-traduites (UTR) en 3' et 5' des ARN et les introns. Ces ARN jouent différents rôles comme dans la traduction par les ARN ribosomiaux (ARNr) et les ARN de transfert, eux-mêmes modifiés par les petits ARN nucléolaires (snoRNA). Plusieurs autres ARN noncodants affectent la régulation génique tels : les riboswitchs, les microARN, les ribozymes, les CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), les petits ARN et les ARN interférents (Mattick & Makunin, 2006).

1.2. Les ribozymes :

Avant les années 1980, on croyait que seules les protéines étaient capables de catalyser des réactions biologiques dans les cellules vivantes, jusqu'à ce que Dr. Thomas Cech et son équipe découvre que l'épissage des ARNm avait toujours lieu même en absence de toute protéine. Ceci a conduit à la découverte du premier ARN ayant une activité catalytique, l'auto-épissage des introns du groupe I (Figure 1.2) (Cech, 1986). Cette découverte a bouleversé les théories de la biologie les plus importantes disant que l'ARN ne jouait qu'un rôle de messenger entre l'ADN qui porte l'information génétique et les protéines qui sont les principaux acteurs des cellules vivantes. Ainsi, diverses autres réactions chimiques ont été réétudiées, ce qui a engendré l'établissement d'une nouvelle classe d'ARN nommée « ribozymes ».

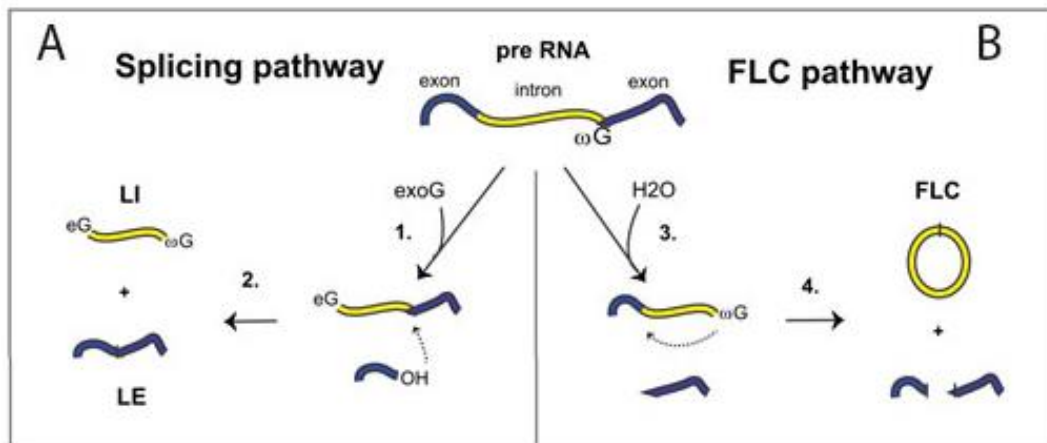


Figure 1.2: Introns de groupe I.

Le ribozyme effectue la réaction d'épissage de deux façons ou agit sur la maturation de l'ARNm : A : l'autoclivage de l'intron des deux extrémités par deux réactions de transestérification suivie de la ligation de deux exons. B : *full-length intron circularization* (FLC) commençant par une réaction d'hydrolyse qui libère un G en 3' qui effectue une attaque nucléophile sur l'extrémité 5' ce qui fait que l'intron devient circulaire et il se libère donc permettant la ligation des deux exons. Tiré de (Hedberg & Johansen, 2013).

La découverte la plus intéressante était que les liaisons peptidiques formées entre les acides aminés pendant la traduction étaient le résultat de l'activité peptidyl transférase d'un ribozyme formé par l'ARNr ce qui a fait du ribosome un ribozyme alors qu'il y avait une croyance que l'ARNr n'était présent que pour lier l'ensemble des protéines du ribosome (Noller *et al.*, 1992) (Steitz & Moore, 2003).

En plus du ribosome, nous pouvons citer les ribozymes suivants :

- Introns des groupe I (Figure 1.2) et groupe II qui sont les deux inclus dans le mécanisme d'épissage d'ARN et la ligation des exons et le groupe II ayant en plus une fonction de retrohoming (Lambowitz & Zimmerly, 2011; Saldanha *et al.*, 1993).
- RNase P une endoribonucléase qui est un complexe de protéines et d'ARN, mais dont le cœur catalytique est formé d'ARN et qui a comme rôle la maturation des ARNt (Guerrier-Takada *et al.*, 1983).
- Petits ARN catalytiques comme les ribozymes en tête de marteau chez les virus satellites et les viroïdes généralement ayant une activité d'auto-clivage inclus dans la réplication de l'ARN génomique (Scott & Klug, 1996).

1.3. Ribozymes en tête de marteaux :

1.3.1. Découverte :

Le ribozyme en tête de marteau ou « hammerhead » a été le troisième ARN avec une activité catalytique à être découvert. Il a été observé pour la première fois en 1986 (Prody *et al.*, 1986) dans l'ARN satellite du '*tobacco ringspot virus*', aussi chez des viroïdes et des virus satellites qui infectent des plantes (Scott, 2010).

1.3.2. Distribution chez les êtres vivants :

Au cours des années, il a été découvert que le ribozyme en tête de marteau est répandu dans presque tous les génomes des procaryotes (bactéries, virus, viroïdes, archaea et bactériophage) et des eucaryotes allant des Amoebozoa jusqu'à quelques ribozymes chez l'être humain (de la Pena & Garcia-Robles, 2010; Hammann *et al.*, 2012) (Perreault *et al.*, 2011) (Tableau 1).

Tableau 1: Distribution des ribozymes en tête de marteau chez les procaryotes tiré de (Hammann *et al.*, 2012)

Group	Number of species	Experimentally verified
Acidobacteria	1 sp.	<i>Solibacter usitatus</i>
Actinobacteria	4 sp.	
Cyanobacteria	3 sp.	
Chloroflexi	1 sp.	
Firmicutes	9 Bacillus sp. 9 Clostridium sp.	<i>Desulfotomaculum reducens</i> , <i>Clostridium scindens</i>
	18 others	
Alphaproteobacteria	6 sp.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Azorhizobium caulinodans</i>
Betaproteobacteria	12 sp.	
Deltaproteobacteria	9 Desulfovibrio sp.	
Gammaproteobacteria	8 Legionella sp. 6 Shewanella sp. 11 Vibrio sp. 9 others	
Archaea	1 sp.	<i>Cenarchaeum symbiosum</i>

Note: based on studies by de la Peña and Garcia-Robles 2010a,b; Jimenez et al. 2011; Perreault et al. 2011; Seehafer et al. 2011.

Chez les eucaryotes le nombre et les positions des ribozymes sont très variables, le plus souvent situés dans des régions noncodantes de l'ARN comme des introns ou des séquences répétées en tandem (rétrotransposition) (*Short Interspersed Nuclear Elements* (SINE)). Dans le génome humain, neuf régions de l'ADN montrent la séquence conservée des ribozymes en tête de marteau, deux de ces régions sont conservées chez quelques autres vertébrés et ont été prouvées être des ribozymes actifs *in vitro* (Hammann *et al.*, 2012).

1.3.3. Les types de structure de ribozyme en tête de marteau :

Selon sa séquence, le ribozyme en tête de marteau peut être soit minimal ou complet.

✓ Ribozyme minimal :

Le ribozyme minimal est celui qui a seulement la séquence nécessaire pour effectuer la réaction d'auto-clivage. Sa structure a été identifiée en 1987 (Haseloff & Gerlach, 1989; Uhlenbeck, 1987). Elle consiste en un segment central formant le cœur catalytique avec une séquence hautement conservée de 15 nucléotides et contient le site catalytique GUH (H= tous les nucléotides sauf G). Le reste de la séquence du ribozyme forme trois tiges par appariement de bases (une jonction à trois brins) qui entourent le cœur catalytique, et les nucléotides de ces tiges sont variables, sauf deux paires de bases sur la tige III et une seule paire sur la tige II sont conservés (Scott *et al.*, 1996) (Figure 1.3).

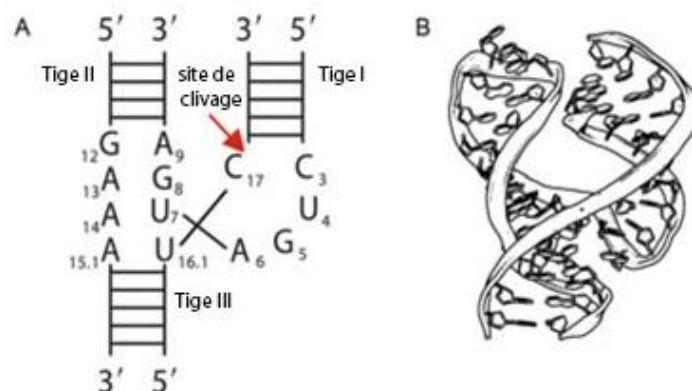


Figure 1.3: Structure d'un ribozyme minimal.

A : structure secondaire du ribozyme minimal montrant les trois tiges avec la séquence conservée du cœur catalytique et le site de clivage (flèche rouge), **B :** la structure cristalline du ribozyme. Adapté de (Scott *et al.*, 2013).

La première structure de cette version de ribozyme a été obtenue par la diffraction aux rayons X d'une séquence d'ARN du ribozyme hybridé à une séquence d'ADN analogue pour empêcher l'auto-clivage (Pley *et al.*, 1994). Peu après, une autre structure a été publiée en

1995, en utilisant comme substrat un ARN modifié ce qui permet au ribozyme de se replier en sa structure tertiaire, mais sans effectuer la réaction de clivage (Scott *et al.*, 1995).

Ces structures cristallisées n'étaient pas d'une grande aide pour comprendre la réaction d'auto-clivage, car les bases n'étaient pas placées comme il était attendu dans une position pour avoir une attaque « in-line » ou ce qui est appelé 'une réaction de transestérification S_N2' ' (Blount & Uhlenbeck, 2005; McKay, 1996). Cette réaction est celle catalysée par un acide ou une base pour échanger deux groupements organiques (R_1 et R_2) entre un ester et un alcool pour que l'ester devienne un ester différent avec son nouveau groupement organique (Figure 1.4).

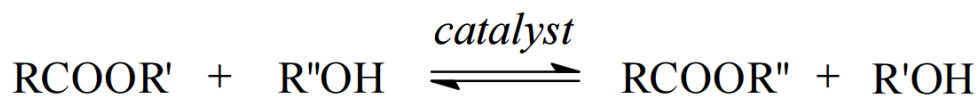


Figure 1.4: Réaction de transestérification.

La réaction correspond à l'échange entre le groupement R' et le groupement R'' pour transformer un ester (RCOOR') en un nouvel ester (RCOOR'') et dans le cas de l'ARN les groupements : R'' = position 2' du ribose, R = position 3' du ribose (+phosphate) et R' = position 5' de l'autre ribose. Tiré de (Schuchardt U, 1998).

Le ribozyme minimal a une K_m (constante de Michaelis) d'à peu près $10 \mu\text{M}$ et un taux de 'turnover' de une molécule/minute, mais en 2003 il a été démontré qu'il y a une interaction tertiaire entre la tige I et II du ribozyme, absente dans cette version minimale, ce qui fait que son activité est faible (De la Pena *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003).

✓ **Ribozyme complet :**

La structure qui représente le contact tertiaire entre les tiges I et II, absent dans la version minimale décrite en 1994, a été déterminée en 2006 à partir d'un ribozyme chez *Schistosoma mansoni* (Martick & Scott, 2006) et elle a été appelée la version complète car elle contient une séquence de plus sur la tige I et II par rapport à la séquence du ribozyme minimal. Et les séquences sur ces tiges interagissent entre elles ce qui donne une structure tertiaire différente. Ces interactions peuvent se former par appariement de bases entre deux régions simples birn comme deux boucles (Figure 1.5) ou entre les nucléotides d'une boucle d'une tige boucle avec les nucléotides d'une autre région de l'ARN en formant ainsi un pseudonoed.

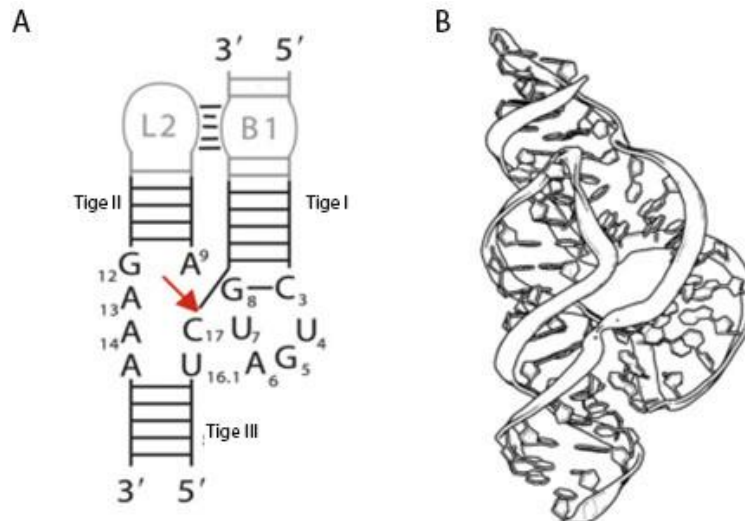


Figure 1.5: Structure d'un ribozyme en tête de marteau complet.

A : structure secondaire du ribozyme complet avec B1 : bulge (renflement) 1, L2 : boucle 2 qui forment l'interaction tertiaire, B : la structure cristalline du ribozyme. Adapté de (Scott *et al.*, 2013).

Le ribozyme complet a un taux de clivage 1000 fois plus important que celui du ribozyme minimal car bien que l'interaction formée entre les tiges I et II est loin du cœur catalytique, elle s'est avérée avoir un effet sur la stabilité du ribozyme en changeant la conformation du site catalytique (Martick & Scott, 2006). Ceci fait que les nucléotides sont placés dans une position d'attaque 'in-line'.

Les brins forment une interaction différente dépendamment de l'organisme, mais il a généralement le même effet sur la structure du ribozyme et sa stabilité, et en plus c'est un motif de structure qui est conservé. Un grand pourcentage (environ 40%) de ces interactions sont en fait des pseudonœuds (Perreault *et al.*, 2011). Une ou plusieurs mutations dans la séquence non conservée, qui est impliquée dans l'interaction entre les tiges I et II, diminuent remarquablement ou inhibent complètement l'activité du ribozyme car cela déstabilise le pseudonœud et la structure tertiaire formée grâce à ce dernier (Perreault *et al.*, 2011).

1.3.4. Dépendance du ribozyme en tête de marteau en ions divalents :

Au début, ces ribozymes étaient considérés comme des métallo-enzymes, ce qui supposait qu'ils requièrent des ions métalliques divalents. Dans le cas du ribozyme en tête de marteau minimal, la présence du Mg^{2+} est nécessaire pour la réaction de clivage (Dahm & Uhlenbeck, 1991). En fait, on a longtemps cru que le Mg^{2+} est inclus dans la réaction acide-base (Dahm *et al.*, 1993), mais après la découverte de l'activité très supérieure de versions plus longues du ribozyme la structure tertiaire, il s'est avéré que le vrai rôle du Mg^{2+} est la stabilisation de

la structure tertiaire du ribozyme qui dépend des charges pendant la réaction du clivage (Lee *et al.*, 2008; Martick *et al.*, 2008). En effet, la présence des charges positives fournies par l'ion divalent diminue la répulsion électrostatique entre les nucléotides causée par l'accumulation des charges négatives résultant de la déprotonation des bases du cœur catalytique.

Le Mg^{2+} est nécessaire à faible concentration *in vivo* (de l'ordre de 1 mM), mais *in vitro* le ribozyme minimal a besoin d'une concentration allant de 10 à 100 mM pour avoir une meilleure activité de clivage (Stage-Zimmermann & Uhlenbeck, 1998). Concernant le ribozyme pleine longueur, les concentrations nécessaires de l'ion divalent sont beaucoup plus petites, de l'ordre des μM ce qui a permis de conclure que le pseudonœud qui se forme dans cette version de ribozyme compense en partie la nécessité de ces ions pour stabiliser le cœur catalytique (Khvorova *et al.*, 2003).

1.3.5. Types de ribozyme en tête de marteau :

Il y a trois types de ribozymes en tête de marteau : I, II et III, selon la tige portant les extrémités 3' et 5'. Si c'est sur la tige I, c'est un ribozyme de type I et ainsi de suite. En d'autres mots, le type du ribozyme correspond à la tige qui n'a pas de boucle (Figure 1.6). Le type III a été le premier des trois à être découvert, mais les types I et II dominaient les premiers ribozymes trouvés dans les génomes des organismes. Le type II a été le dernier à être découvert, il est plus répandu dans les génomes de microorganismes (Hammann *et al.*, 2012).

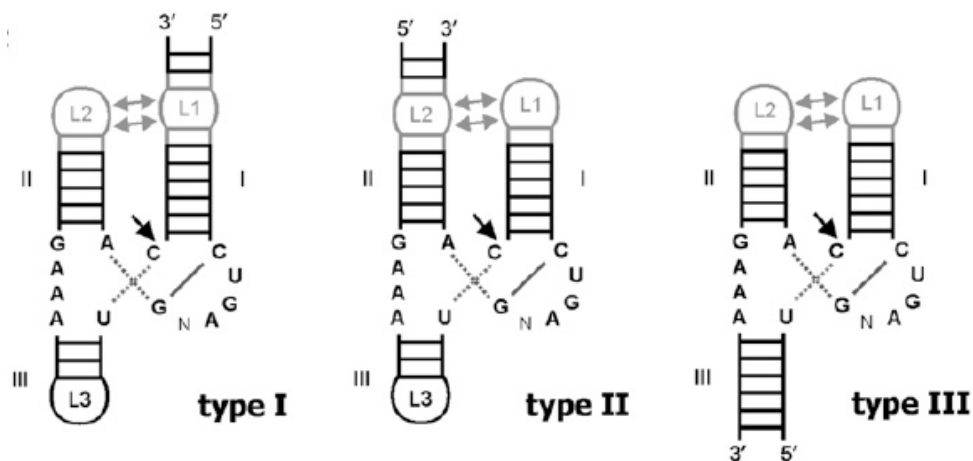


Figure 1.6: Les types de ribozyme en tête de marteau.

L1, L2, L3 indiquent les boucles (*loop*) 1, 2 et 3, la flèche indique le site de clivage, et I, II et III sont les tiges. Le type I est un ribozyme ne présentant une boucle sur la tige I, le type II n'a pas de boucle sur la tige III ainsi que le type III est sans boucle sur la tige III. Tiré de (Hammann *et al.*, 2012).

1.3.6. Mécanisme d'action :

La réaction catalytique effectuée par le ribozyme en tête de marteau est une réaction d'auto-clivage. Lors de la découverte du ribozyme dans le génome des ARN satellite et viroïde elle était clairement impliquée dans le processus de la réplication circulaire de leurs génomes formés d'ARN, pour libérer la nouvelle copie de ce génome (Figure 1.7).

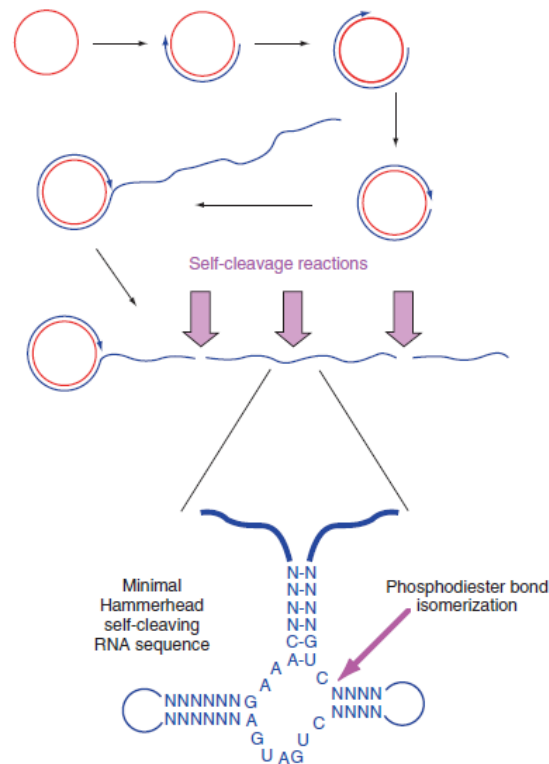


Figure 1.7: Réplication circulaire et rôle du ribozyme en tête de marteau.

Le génome d'un virus se replie d'une façon circulaire et c'est l'auto-clivage du ribozyme qui permet la libération de la nouvelle copie. Le cercle rouge est l'ARN circulaire du virus, la flèche bleue est la nouvelle copie du génome et la structure en bas est la structure du ribozyme en tête de marteau qui effectue la réaction de clivage. Tiré de (Scott, 2010).

La réaction de clivage consiste en une réaction de transestérification qui se passe dans le site de clivage RUH où le H (tout sauf G) est généralement un C et elle donne comme résultat deux segments : un 5' avec un phosphate cyclique 2',3' et un segment 3' avec une terminaison 5'-OH. La réaction commence par l'enlèvement d'un proton du 'N1' du nucléotide G12 par une molécule d'eau, le G12 (Figure 1.8) qui devient ionisé joue le rôle de la base générale dans la réaction d'acide-base incluse dans le clivage et arrache un proton 'H⁺' du groupement 2'-OH du C17 car les deux nucléotides sont alignés d'une façon à permettre une substitution nucléophile (S_N2). Le C17 devient donc le nucléophile du site catalytique pour attaquer le groupement phosphate de C 1.1 (N 1.1 dans Figure 1.8). En même temps, le groupement 2'-OH du G8

effectuant la catalyse acide cède son proton au groupement 5'-O du C1.1. Finalement, le G8 gagne le proton qui était cédé par le G12 et par ceci la réaction de clivage est finie en générant une extrémité 5'-OH et un phosphate cyclique 2',3' (Schultz *et al.*, 2014) (Figure 1.8). En fait, le positionnement des nucléotides au cours de la réaction est appelé 'état de transition' permettant le passage de l'état non clivé du ribozyme à l'état clivé (Figure 1.8).

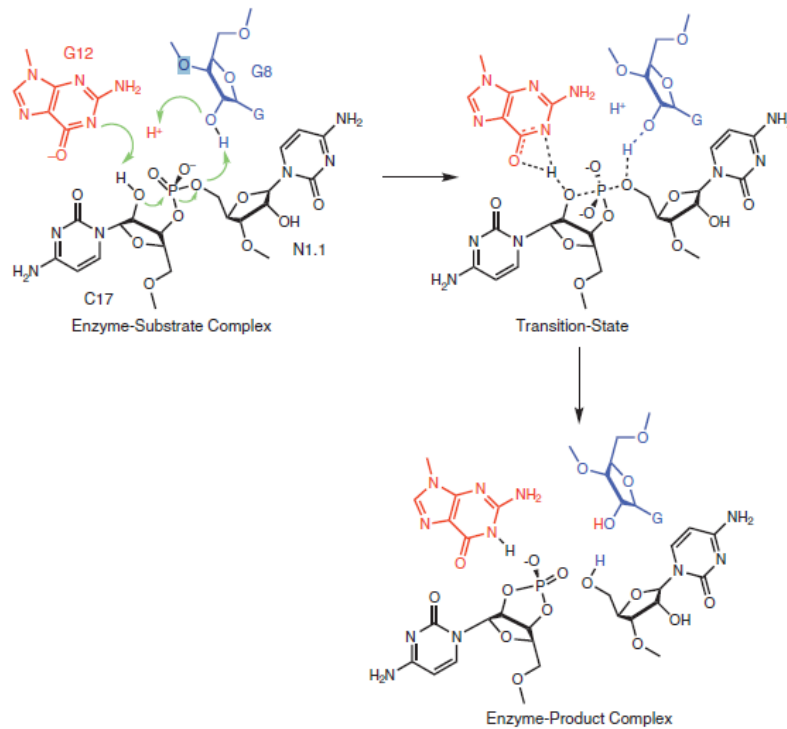


Figure 1.8: Les états du site actif du ribozyme en tête de marteau.

La formation du pseudonoeud permet au nucléotide C1.1 et le C17 d'être en conformation de 'in-line attack' pour effectuer la réaction de clivage afin de donner deux segments représentant l'un l'enzyme et l'autre le produit de la réaction. (Scott, 2010).

1.3.7. Utilisation du ribozyme en tête de marteau :

La séquence du ribozyme en tête de marteau peut être manipulée de manière à concevoir un ribozyme fonctionnel en *trans*, c'est-à-dire qu'il devient capable d'aller cliver d'autres ARN (Figure 1.9). Ceci est fait par la conception d'un ribozyme avec des tiges I et III simples brins et leur séquence est conçue par complémentarité de bases à la séquence de l'ARN cible de part et d'autre du site de clivage. Ce site est préférentiellement RUH où le R est un A ou G, mais préférentiellement un G, et le H est n'importe quelle base sauf G, mais préférentiellement un C.

En effet ce principe était largement utilisé pour le contrôle des gènes, dont plusieurs études dans une optique de thérapie géniques. Des ribozymes ont été conçus contre des gènes de virus comme l'hépatite C (HCV) (Sakamoto *et al.*, 1996) et du virus de l'immunodéficience

humaine (HIV) (Bai *et al.*, 2002). Ils étaient appliqués aussi contre des gènes impliqués dans le cancer, surtout des oncogènes comme C-myc qui est surexprimé dans certains cancer (Cheng *et al.*, 2000) et des gènes inclus dans des maladies héréditaires, par exemple la version autosomique dominante de '*retinitis pigmentosa*' qui peut causer la perte de la vision, les ribozymes étaient dirigés contre la version du gène (muté) qui cause la maladie (Drenser *et al.*, 1998).

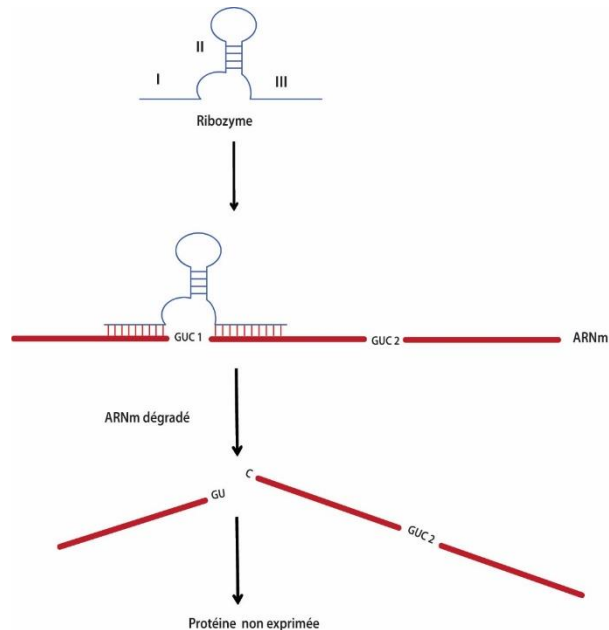


Figure 1.9 : Ribozyme en tête de marteau actif en *trans*.

Le ribozyme ayant des séquences des tiges I et III complémentaires à la séquence de l'ARNm cible s'hybride à ce dernier en reconnaissant le site de clivage (GUC). Le cœur catalytique du ribozyme effectue la réaction du clivage causant ainsi la dégradation de l'ARNm cible.

1.4. Riboswitchs :

1.4.1. Définition et historique :

Les *riboswitchs* constituent une classe d'ARN noncodants qui sont impliqués dans la régulation de l'expression génique. Ils sont actifs *en cis*, et ils sont des ARN allostériques car leur activité, initiée par un changement conformationnel, est dépendante de la présence ou l'absence d'un certain métabolite. Ils sont généralement situés dans la région 5' non-traduite de l'ARNm (5'UTR) et parfois dans la partie 3' (3'UTR) (Figure 1.10).

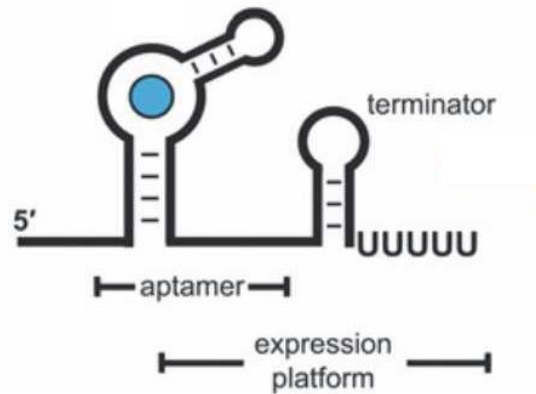


Figure 1.10: Structure d'un riboswitch.

L'aptamère est la partie qui lie le ligand et la plateforme d'expression inclus une séquence qui forme un terminateur de transcription. Tiré de (Kim & Breaker, 2008).

Plusieurs études ont décrit la présence de régions conservées d'ARNm qui détectent des dérivés des vitamines B₁, B₂ et B₁₂ en induisant l'inhibition de la biosynthèse de ces derniers chez les procaryotes (Gold *et al.*, 1997a; Gold *et al.*, 1997b) (Gelfand *et al.*, 1999) (Miranda-Rios *et al.*, 2001) (Stormo & Ji, 2001). Toutefois, le laboratoire de Dr Ronald Breaker a le premier confirmé qu'une partie non traduite de l'ARNm est capable de lier directement une molécule pour réguler l'expression de la coenzyme B₁₂ par un « switch » entre les deux états 'ON' et 'OFF'. Ainsi, le nom « *riboswitch* » a été donné à ces ARN régulateurs par Dr. Breaker en 2002 (Nahvi *et al.*, 2002) (Breaker, 2011).

Depuis, des *riboswitchs* répondant à une panoplie de molécules ont été découverts: acides aminés (glycine, lysine...), les purines et certains de leurs dérivés (guanine, adénine, prequeuosine1...), des coenzymes (cobalamine, thiamine pyrophosphate...), des cations métalliques (manganèse, nickel, cobalt...) ou des anions (fluor) (Serganov & Nudler, 2013). Les *riboswitchs* peuvent appartenir à des classes différentes dépendamment de leurs structures. En effet nous trouvons des *riboswitchs* liant le même ligand, mais appartenant à des classes différentes, comme pour les cinq classes différentes de *riboswitchs* liant la S-adenosyl-methionine (SAM). Structure des *riboswitches* :

Une séquence de *riboswitch* est formée par deux domaines : un aptamère et une plateforme d'expression (Figure 1.10).

✓ **L'aptamère :**

L'aptamère est la partie qui lie le ligand spécifique et il a généralement une structure secondaire complexe et c'est le repliement de l'ARN en cette structure qui permet la liaison spécifique d'une certaine molécule et pas une autre. En fait, la structure adoptée par l'aptamère diffère selon la présence ou l'absence de la molécule cible ce qui induit la présence de deux conformations compétitives (liée et non liée) (Winkler *et al.*, 2003), (Serganov & Nudler, 2013).

La séquence d'un aptamère a généralement une longueur allant de 70 à 170 nucléotides (Winkler *et al.*, 2003), et pour un *riboswitch* donné la séquence peut changer, mais la structure est fortement conservée parmi les organismes. C'est sur ce principe qu'est basée « la covariance », la variation des séquences qui constituent les paires de bases, utilisée dans les méthodes bio-informatiques pour chercher de nouveaux *riboswitchs*. En plus c'est la structure de l'aptamère qui détermine à quelle classe chaque *riboswitch* appartient (Tucker & Breaker, 2005).

Il n'y a pas une structure conservée pour tous les aptamères, mais il y a des motifs présents dans la majorité des *riboswitchs* comme les 'jonctions multihélicoïdales' (*multihelical junction*) et les pseudonoeuds (Serganov & Nudler, 2013).

✓ **La plateforme d'expression :**

La plateforme d'expression est la partie directement impliquée dans la régulation génique et le changement conformationnel de sa structure est sous l'influence de l'aptamère, s'il est lié ou non à son ligand spécifique.

Selon le mécanisme d'action du *riboswitch* ce domaine peut se replier en une architecture différente: comme un terminateur de transcription ou une tige qui séquestre le site de liaison du ribosome, ce qui fait que la plateforme d'expression d'un *riboswitch* donné est moins conservée que l'aptamère en séquence et en structure (Winkler *et al.*, 2003)

1.4.2. Mécanismes d'action :

La fonction des *riboswitchs* est généralement une rétroaction négative directe sur l'expression du gène en aval et la production de la molécule qu'il détecte par son aptamère. Il agit typiquement soit sur la transcription ou sur la traduction.

✓ **Au niveau de la transcription :**

Lorsque la liaison du ligand sur l'aptamère induit la formation d'un terminateur de transcription, qui est une tige en forme d'épingle à cheveux suivi de plusieurs uridines, il y a inhibition (*OFF*

switch). La présence du terminateur déstabilise l'ARN polymérase qui va libérer le nouvel ARN partiellement formé et ainsi toute la séquence qui vient après n'est pas transcrite (Figure 1.11).

Lorsque l'aptamère lie son ligand et que la plateforme d'expression se replie en un anti-terminateur qui séquestre des nucléotides nécessaires pour la formation du terminateur, il y a activation (*ON switch*). Ceci permet à l'ARN polymérase de poursuivre la transcription du ou des gènes qui viennent après le *riboswitch* (Barrick & Breaker, 2007) (Serganov & Nudler, 2013) (Figure 1.11).

✓ **Au niveau de la traduction :**

Les *riboswitchs* agissent de la même façon sur la traduction, soit par inhibition ou par activation, mais les conformations adoptées par la plateforme d'expression dans ce cas sont plus variées et c'est l'initiation de la traduction que les *riboswitchs* contrôlent alors.

Ainsi, le *switch OFF* consiste en la formation d'une structure, comme une tige boucle, qui séquestre le site de liaison de ribosome (RBS) pour empêcher l'unité 30S du ribosome de se fixer dessus et initier la traduction.

Dans le cas contraire, le *switch ON*, la structure qui se forme libère le RBS qui était caché permettant ainsi au ribosome de se fixer à son site et de traduire le gène en aval (Barrick & Breaker, 2007) (Serganov & Nudler, 2013) (Figure 1.11).

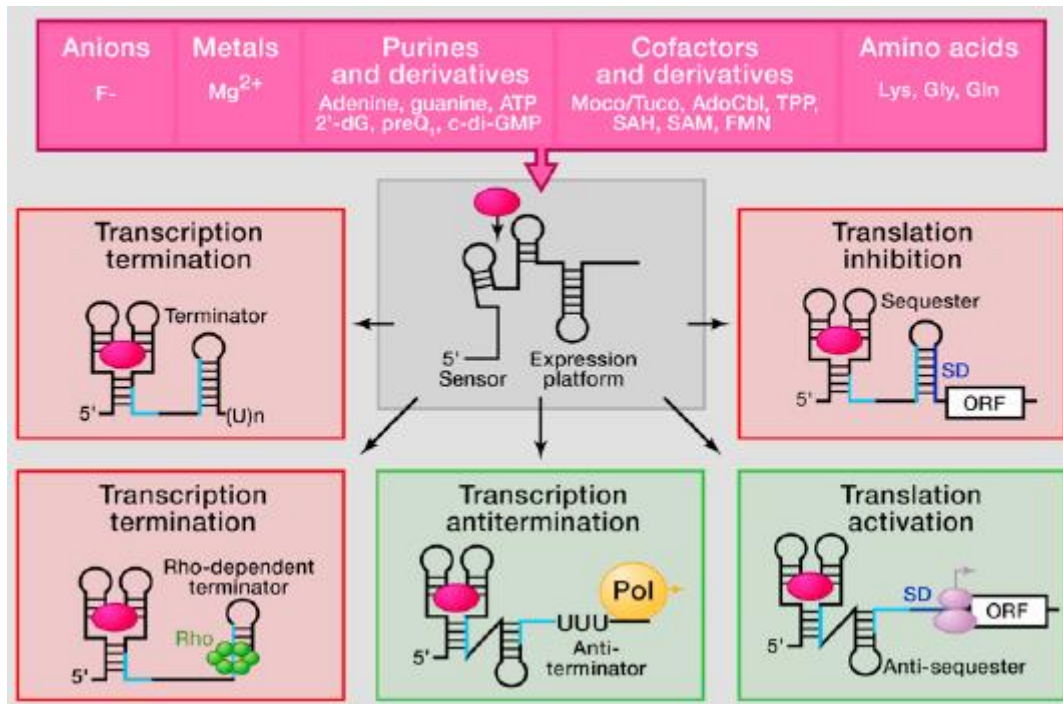


Figure 1.11: Mécanisme d'action des riboswitchs au niveau de la transcription et la traduction.

Pour la transcription, la liaison du ligand à l'aptamère induit la formation soit d'un terminateur de transcription qui est reconnu par la protéine Rho ce qui va causer la terminaison de la transcription, soit la plateforme de transcription forme un anti-terminateur qui permet la poursuite de la transcription. Dans le cas de la traduction, lors de la liaison du ligand, la plateforme d'expression peut former une structure qui séquestre le RBS. Tiré de (Serganov & Nudler, 2013).

-Autres méthodes de contrôle de l'expression :

✓ **Dégradation de l'ARN**

Clivage de l'ARNm lors de la liaison du ligand sur son aptamère, c'est le mécanisme utilisé par un seul *riboswitch*, le ribozyme glucosamine-6-phosphate (GlmS) (Winkler *et al.*, 2004). Après la coupure de l'ARNm par le *riboswitch*, la RNase J dégrade la partie en aval de l'ARN coupé ce qui empêche donc la traduction (Collins *et al.*, 2007) (Figure 1.12).

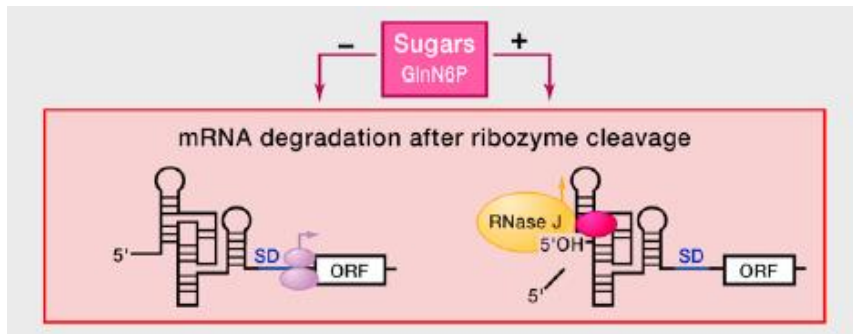


Figure 1.12: Mécanisme d'action du *riboswitch* GlnS.

En absence du ligand, la traduction se déroule d'une façon normale car le ribosome peut atteindre le RBS et effectue sa fonction, mais en présence du GlnN6P l'ARNm se clive en empêchant le ribosome d'atteindre le SD et il sera dégradé par la Rnase J. Tiré de (Serganov & Nudler, 2013).

✓ **Épissage de l'ARN :**

Un autre exemple atypique de mécanisme d'action existe où le *riboswitch* est situé proche d'un intron du groupe I (un ribozyme), c'est un cas qui implique un *riboswitch* di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP-II) pour lequel la liaison du ligand à son aptamère induit l'activation de la traduction via une cascade de réactions à l'aide du guanosine triphosphate (GTP), pour aboutir à l'auto-clivage de l'intron, permettant alors l'assemblage des deux portions du RBS pour permettre l'initiation de la traduction (Figure 1.13).

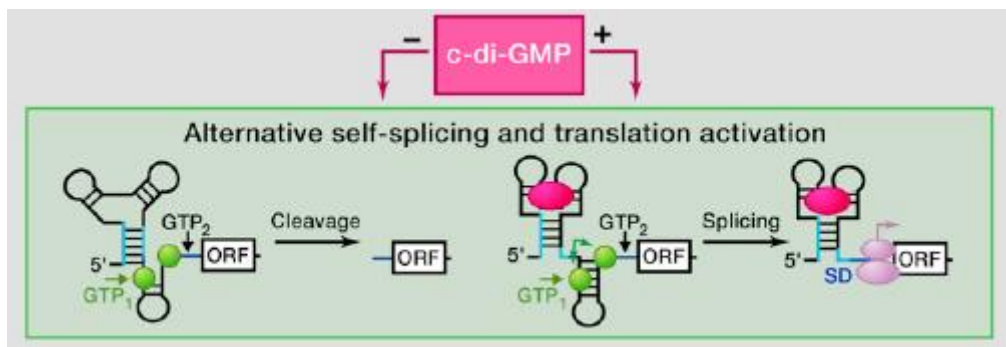


Figure 1.13: Mécanisme d'action du *riboswitch* au niveau de l'épissage

En absence du ligand, le clivage se fait dans le site GTP₂ ce qui donne un RBS tronqué ne permettant pas la traduction de l'ARN. En présence du ligand l'intron du groupe I effectue une réaction de clivage en utilisant les deux sites GTP₁ (en vert) ce qui permet l'assemblage des deux parties du RBS et donc la traduction de l'ARN. Tiré de (Serganov & Nudler, 2013).

✓ **Stratégie anti-sens :**

Les *riboswitchs* SAM SreA et SreB chez *Listeria monocytogenes* sont actifs en *trans*. Ces *riboswitchs* sont situés devant un gène codant pour un ARN anti-sens qui, en absence du SAM, est transcrit de façon à inhiber et dégrader l'ARN d'un gène d'intérêt dans le métabolisme de la méthionine. Cependant, en présence de SAM, un terminateur de transcription est formé,

empêchant ainsi l'expression de l'ARN anti-sens et permettant l'expression du gène impliqué dans le métabolisme de la méthionine (Loh *et al.*, 2009) (Figure 1.14).

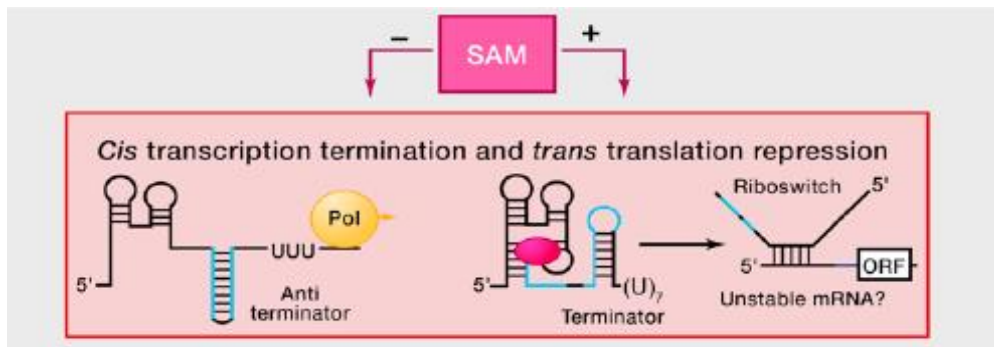


Figure 1.14: Stratégie anti-sens du riboswitch SAM

En absence du SAM la transcription de l'ARN anti-sens se déroule d'une façon normale, mais en présence du SAM un terminateur de transcription se forme, ce qui induit la terminaison de la transcription et l'ARN tronqué du *riboswitch* s'hybride à l'ARN anti-sens et le potentiellement plus susceptible à être dégradé. Tiré de (Serganov & Nudler, 2013).

✓ **La réponse en présence de plus qu'un aptamère :**

Il y a des *riboswitchs* qui possèdent plusieurs aptamères comme le *riboswitch* de la glycine ayant deux aptamères et dont la réponse dépend de la liaison du ligand sur les deux en même temps (Mandal *et al.*, 2004) (Figure 1.15). D'autres *riboswitchs*, comme certains exemples des *riboswitchs* de la thiamine pyrophosphate (TPP) ou de l'adénosylcobalamine (AdoCbl) contiennent plus d'un aptamère et il semble que chacun d'eux fonctionne par lui-même en tant que *riboswitch* indépendant (Barrick & Breaker, 2007).

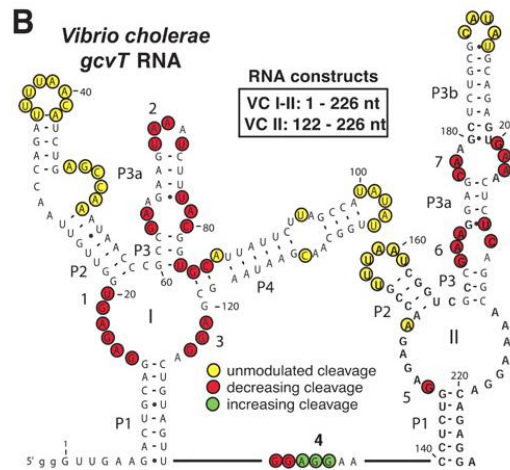


Figure 1.15: Structure des aptamères du riboswitch de la glycine.

Le *riboswitch* de la glycine chez *Vibrio cholerae* a deux aptamères 'I et II'. La liaison du ligand à ces deux aptamère est nécessaire pour le fonctionnement du *riboswitch*. Les 'P' indiquent les tiges. Tiré de (Mandal *et al.*, 2004).

1.4.3. Mécanisme d'action chez les eucaryotes :

Chez les eucaryotes, le *riboswitch* du TPP contrôle l'épissage alternatif de certains ARNm. Cet épissage est une étape de maturation de l'ARN qui va donner la séquence finale de l'ARN qui sera traduit en protéine où les introns sont enlevés et les exons sont liés.

L'un des mécanismes est qu'en absence du ligand, la structure du *riboswitch* séquestre un site d'épissage et le résultat d'épissage donc est un ARNm mature prêt à être traduit en une protéine complète. Alors qu'en présence du ligand la structure du *riboswitch* change en libérant le site d'épissage alternatif permettant donc à la machinerie d'épissage d'enlever cette partie de la séquence et par conséquent l'ARN final donne naissance à une protéine incomplète ou aberrante (Figure 1.16) (Cheah *et al.*, 2007; Croft *et al.*, 2007) (Serganov & Nudler, 2013).

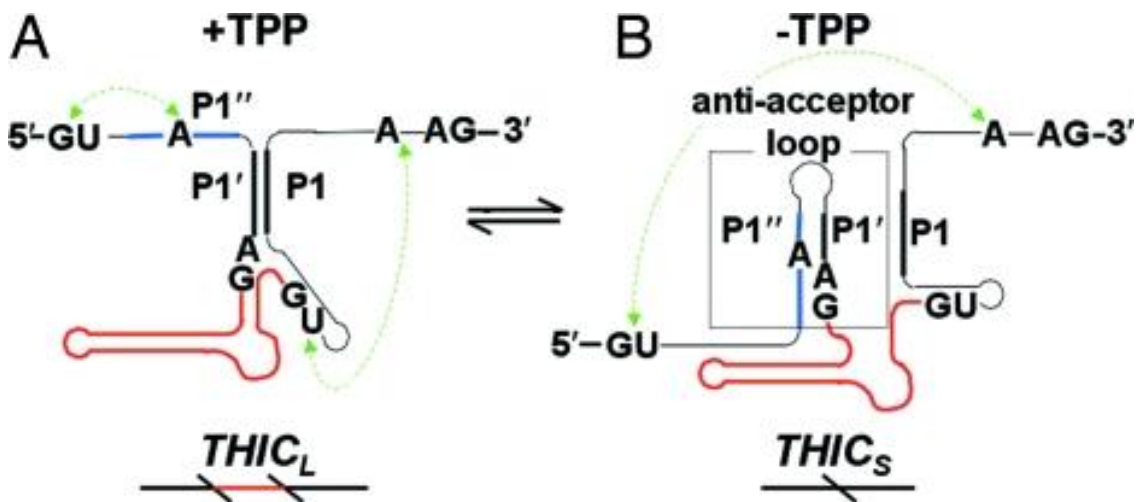


Figure 1.16 : Mécanisme d'action du *riboswitch* de TPP chez les eucaryotes.

Chez l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* le *riboswitch* TPP est présent dans un intron du gène THIC codant la phosphomethylperimidine synthase. A : en présence du TPP l'épissage alternatif se fait entre les sites A et GU des deux côtés (en bleu et en noir) comme indiqué par les flèches vertes ce qui fait que la partie rouge n'appartenant à la séquence codante est toujours présente et ceci donne naissance à une protéine aberrante. B : en absence du TPP le *riboswitch* change de conformation donc le site A du côté bleu et le site GU du côté noir sont inclus dans des tiges donc l'épissage se fait entre le site GU en 5' et le site A du côté 3' (flèche verte). Ceci permet l'enlèvement de la partie rouge et l'assemblage des deux exons que leur traduction donne naissance à une protéine fonctionnelle. Tiré de ((Cheah *et al.*, 2007; Croft *et al.*, 2007).

1.4.4. Riboswitch SAM :

Ce sont les *riboswitchs* qui lient la S-adénosylméthionine (SAM), ils sont impliqués dans le métabolisme du soufre, de la biosynthèse de cystéine, de méthionine et du S-adénosylméthionine. Il y a plusieurs *riboswitchs* SAM ayant des structures différentes, ils sont classés en cinq différentes classes allant de I à V dépendamment de l'architecture de l'aptamère (Figure 1.17). Dans ce projet, nous avons utilisé le *riboswitch* SAM I, le premier *S-box* à être confirmé en 2003 et principalement trouvé chez les bactéries Gram-positif (Winkler *et al.*, 2003).

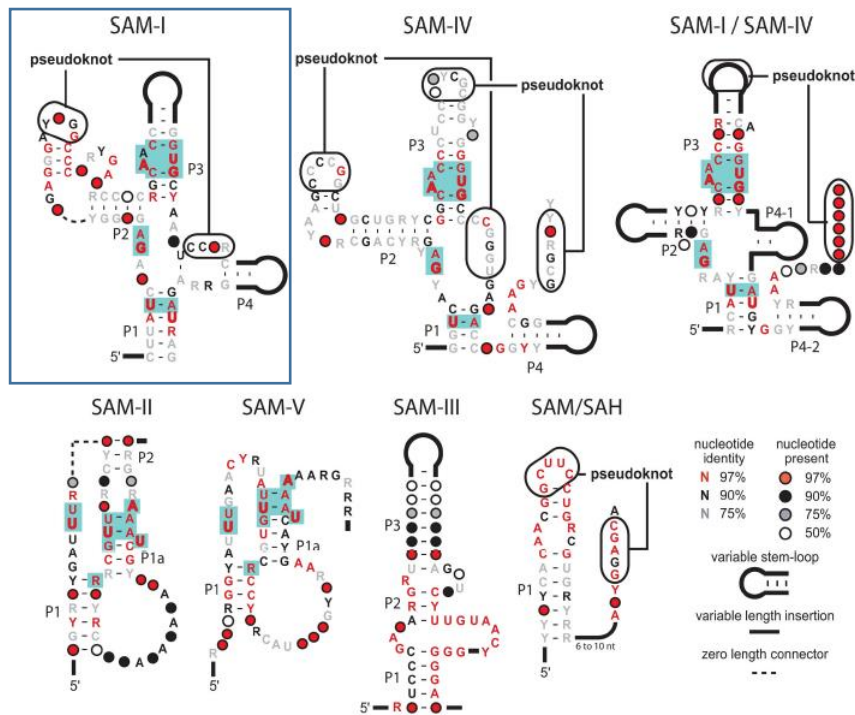


Figure 1.17 : Les aptamères des différentes classes des riboswitchs SAM.

Le riboswitch SAM présente plusieurs structures d'aptamères classé de SAM I à SAM V : les 'P' indiquent les tiges, les cercles entourent les parties des séquences qui sont incluses dans des pseudonœuds et les nucléotides en rouges sont les nucléotides hautement conservés (97%) chez les différentes espèces. Le SAM I encadré est le *riboswitch* utilisé dans notre projet. Tiré de (Breaker, 2011).

- **Structure :**

L'aptamère de SAM I a une structure consensus assez complexe et sa longueur varie entre 100 et 150 nucléotides. En effet, la structure de l'aptamère du riboswitch SAM I est une jonction de trois tiges boucles et une tige présentant deux motifs conservés qui sont : un pseudonœud entre les tiges P2 et P4 (Figure 1.17) et un '*Kink-turn*' qui consiste en une boucle interne qui donne un angle précis entre deux hélices (Montange & Batey, 2006). Ce riboswitch a une constante de dissociation (K_d) de 4 nmol chez *Bacillus subtilis*. Cependant, le moindre changement peut affecter la K_d , comme par exemple l'ajout de la plateforme d'expression fait passer le K_d à presque 200 nmol. (Winkler *et al.*, 2003).

- **Mécanisme d'action :**

Ces *riboswitchs* agissent souvent par inhibition de la transcription, et ce, par la formation d'un terminateur de transcription en présence du SAM à une concentration suffisante (Winkler *et al.*, 2003). En ce sens, il est plus facile à transposer dans un contexte différent puisqu'il n'est pas nécessaire de fusionner la séquence avec précision au cadre ouvert de lecture.

1.4.5. Riboswitch Lysine :

Ce *riboswitch* a aussi été découvert en 2003 par le laboratoire de Dr. Breaker (Sudarsan *et al.*, 2003) après une recherche basée sur le fait que la transcription du gène *lysC* est inhibée en présence d'une haute concentration de lysine chez *Bacillus subtilis* et *E. coli* (Kochhar & Paulus, 1996; Mader *et al.*, 2002; Patte *et al.*, 1998). Le gène *lysC* code pour l'enzyme aspartokinase II qui catalyse la conversion de l'acide L-aspartique en L-lysine (Belitsky, 2002) et comme aucune protéine n'avait été découverte pour le mécanisme régulateur de l'expression de cette enzyme (Liao & Hseu, 1998), les chercheurs ont pensé à la présence d'un ARN régulateur.

Le *riboswitch* est situé dans la partie 5'UTR du gène *lysC* dans un domaine nommé le *L-box* qui existe aussi dans le 5'UTR d'autres gènes inclus dans la biosynthèse de la lysine (Sudarsan *et al.*, 2003).

- **Structure :**

Le *riboswitch* de la lysine présente une structure conservée, c'est une jonction de cinq tiges-boucles contenant 56 nucléotides hautement conservés dans les parties formant des paires de bases autour de la poche de liaison de la L-lysine. Plusieurs interactions tertiaires (K-turn et E-loop) stabilisent la structure du *riboswitch* et sont nécessaires pour son fonctionnement (Blouin *et al.*, 2011) (Figure 1.18).

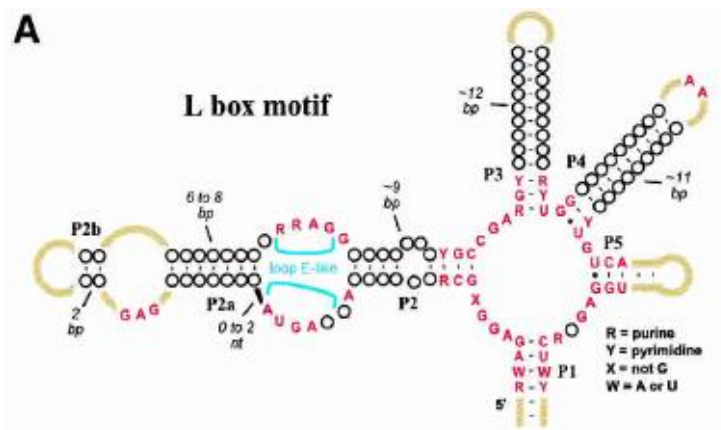


Figure 1.18: Structure de l'aptamère du riboswitch Lysine.

L'aptamère est formé de cinq tiges boucles indiqué par les 'P' entourant la poche de liaison de le L-lysine (nucléotide en rose). Tiré de (Sudarsan *et al.*, 2003).

- **Mécanisme d'action :**

La fixation de la L-lysine sur son aptamère induit la formation d'un terminateur de transcription et empêche la transcription du gène *lysC*. Ce *riboswitch* a une K_d de 1 μ M et il est capable de distinguer la L-lysine de molécules très semblables telles que la D-lysine et l'ornithine. Par contre, deux autres analogues de la lysine, la L-lysine hydroxymate et le AEC (*antimetabolite compound*) causent aussi la terminaison de la transcription. Ce *riboswitch* peut donc être utilisé comme cible pour une antibiothérapie de façon à déréguler l'expression génique. En effet, l'utilisation des analogues de lysine capables de causer l'arrêt de transcription de l'aspartokinase II va empêcher la conversion de l'acide L-aspartique en L-lysine et affecter la synthèse d'autres métabolites nécessaire à la survie de la bactérie (Sudarsan *et al.*, 2003).

1.4.6. Génération de nouveaux riboswitchs :

Des *riboswitchs* synthétiques peuvent être développés. La technique nommée SELEX : *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*, permet la sélection d'un aptamère pour n'importe quelle molécule et à cet aptamère une séquence de plateforme d'expression convenable peut être ajoutée. Le SELEX consiste à utiliser une librairie de 10^{13} à 10^{15} d'oligonucléotides aléatoires (ADN ou ARN) mais qui ont des séquences des extrémités 3' et 5' connus qui seront utiliser pour l'étape de l'amplification. Cette librairie est mise en présence de la molécule d'intérêt ensuite une étape d'éluion est faite pour éliminer les séquences qui n'étaient pas liées à la molécule et garder celles qui s'y lient. Ces séquences sont amplifiées par PCR (aptamère d'ADN) ou par une RT-PCR (aptamère d'ARN) en utilisant comme amorces des séquences complémentaires aux extrémités 3' et 5'. L'ADN issu de la PCR est double brin donc une étape de sélection des ADN simples brin ou de dégradation de l'un des brins est rajoutée dans le cas des aptamères d'ADN, et pour les aptamère d'ARN une transcription suivie d'une purification d'ARN sont effectuées. La sélection est répétée plusieurs fois pour enrichir les oligonucléotides se liant le plus fortement aux molécules. Des cycles de sélections négatives sont aussi faits sur des molécules différentes pour s'assurer de la spécificité de l'aptamère obtenu, d'où les oligonucléotides liant fortement la molécule d'intérêt mais liant aussi une autre molécule non spécifique sont éliminés. Les cycles de sélection s'arrêtent lorsque les séquences enrichis atteignent une saturation c'est-à-dire que ce sont les mêmes séquences qui se lient à haute affinité au ligand après chaque cycle. Ces séquences sont finalement clonées et séquencées (Mok & Li, 2008) (Figure 1.19).

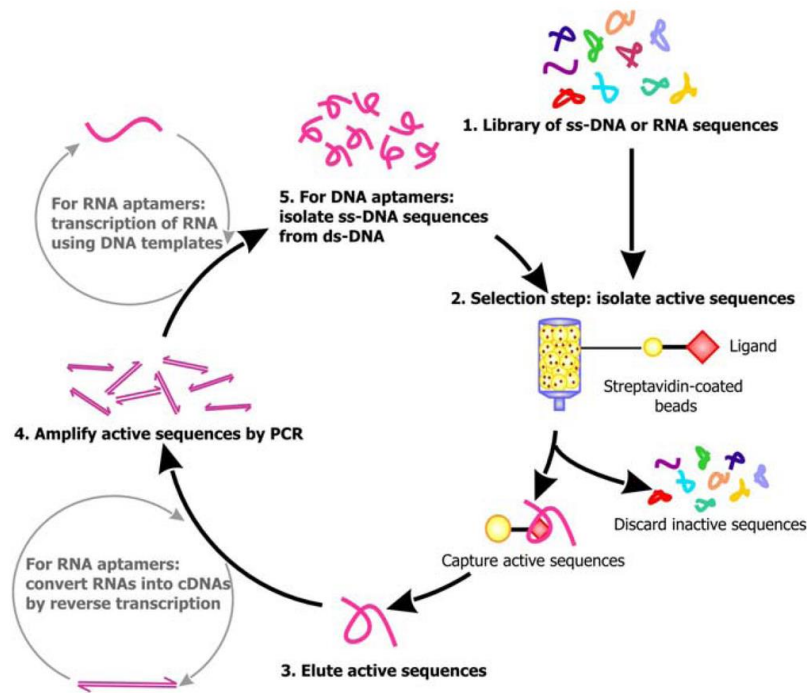


Figure 1.19: Schéma explicatif des étapes de SELEX.

Le SELEX consiste à mettre une librairie d'ADN ou d'ARN de séquences aléatoires avec la molécule d'intérêt après une étape d'éluion est faite par chromatographie d'affinité pour éliminer les séquences qui n'étaient pas liées et garder celles étaient liées. Une étape d'amplification de ces séquences vient après, pour les aptamères d'ADN les séquences simple brin sont isolées et pour l'ARN une transcription doit être faite après la PCR, puis le cycle est refait. Tiré de (Mok & Li, 2008).

1.5. Circuit logique :

La régulation génétique est complexe et permet d'intégrer plusieurs informations sur l'environnement et de s'y adapter en conséquence. Ainsi, la régulation agit un peu comme un programme d'ordinateur.

1.5.1. Les fonctions logiques :

Les opérations logiques représentent une application mathématique des fonctions booléennes sous la forme de B^n où 'n' est le nombre de données d'entrée qui peuvent être soit 'Vraie' soit 'Fausse' et leur combinaison donnera une valeur 'Vrai' ou 'Fausse' (Benenson, 2009). Ces opérateurs sont la base numérique où Vrai est 1 et faux est 0. À partir de ces deux valeurs, plusieurs lois (Tinder, 2000) sont mises en place :

- **Conjonction : ET (AND) :**

Pour deux variables (données) a et b, la valeur 'a et b' n'est VRAI que lorsque 'a' est vrai et 'b' est vrai (Figure 1.20).

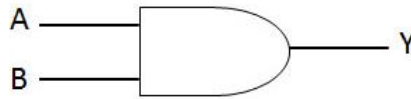


Figure1.20: Représentation de la fonction ET

Tableau 2 : Table de vérité de la fonction ET

a	B	a et b
0	0	0
1	0	0
0	1	0
1	1	1

- **Disjonction : OU (OR) :**

C'est lorsque a ou b est vrai de même que lorsque a et b sont les deux vrais. (Figure 1.21)

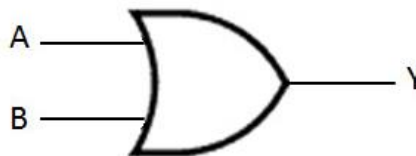


Figure 1.21: Représentation de la fonction OU

Tableau 3 Table de vérité de la fonction OU

a	B	a ou b
0	0	0
1	0	1
0	1	1
1	1	1

- **Négation : NON (NOT)**

Dans ce cas Y n'est vrai que lorsque a est faux. (Figure 1.22)

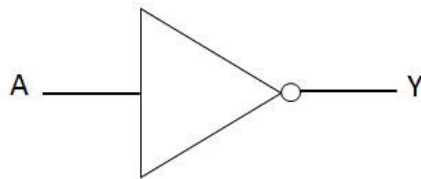


Figure 1.22: Représentation de la fonction NON

Tableau 4 : Table de vérité de la fonction NON

A	Non a
0	1
1	0

- **Non-ET (NAND) :**

Le résultat 'a et b' n'est vrai que lorsque le a ou le b est faux ou les deux sont faux. (Figure 1.23)

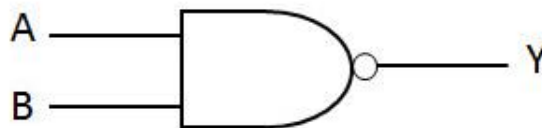


Figure1.23: Représentation de la fonction NON-ET

Tableau 5 : Table de vérité de la fonction NON-ET

a	B	Non a et b
0	0	1
1	0	1
0	1	1
1	1	0

- **Non-OU (NOR) :**

Le résultat 'a ou b' n'est vrai que lorsque a est faux et b est faux. (Figure 1.24)

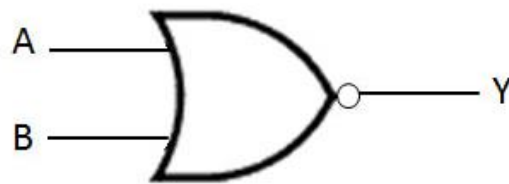


Figure 1.24: Représentation de la fonction NON-OU

Tableau 6 : Table de vérité de la fonction NON-OU

a	B	Non a ou b
0	0	1
1	0	0
0	1	0
1	1	0

- **Disjonction exclusive XOR :**

C'est lorsque 'a ou b' est vrai seulement quand 'a' est vrai et 'b' est faux ou lorsque 'a' est faux et 'b' est vrai, mais pas quand 'a et b' sont vrais. (Figure 1.25)

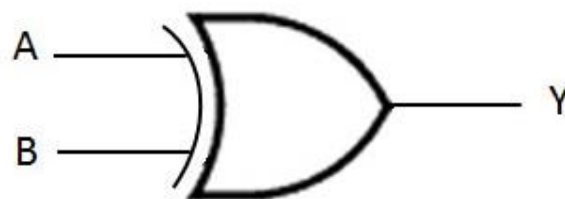


Figure 1.25: Représentation de la fonction XOR

Tableau 7 : Table de vérité de la fonction XOR

a	B	a ou b
0	0	0
1	0	1
0	1	1
1	1	0

- **Négation de disjonction exclusive-XNOR :**

Le 'a ou b' n'est vrai que lorsque le 'a' est faux et le 'b' est faux ou lorsque le 'a' est vrai et le 'b' est vrai, c'est complètement l'inverse du XOR (Figure 1.26).



Figure 1.26: Représentation de la fonction X-NOR

Tableau 8 : Table de vérité de la fonction X-NOR

a	B	a ou b
0	0	1
1	0	0
0	1	0
1	1	1

1.5.2. Les portes logiques (logic gates) :

Ce sont les outils essentiels pour former les circuits numériques par l'application des fonctions logiques (booléennes) pour donner un seul résultat comme sortie à partir de plusieurs données d'entrée (Voigt, 2006).

1.5.3. Application de la logique en biologie

- **La biologie synthétique :**

C'est le point de rencontre de la biologie avec l'ingénierie, c'est une façon de donner de nouvelles fonctions aux cellules vivantes en appliquant des lois mathématiques. Par exemple, les fonctions logiques utilisées dans les circuits électroniques. Ceci est préconisé dans le but de résoudre les problèmes de santé des gens ou d'améliorer la qualité de la vie dans la société pour les atteintes liées à l'environnement, trouver une source d'énergie renouvelable, fournir des aliments de bonne qualité, d'une façon facile et fiable (Endy, 2005).

La découverte de l'opéron lac (Jacob & Monod, 1961) a montré que les cellules utilisent déjà la logique mathématique pour réguler l'expression génique. Donc l'idée a passé de l'ingénierie génétique pour réguler l'expression des gènes au développement de systèmes complexes

pour former des organismes qui possèderaient de nouvelles fonctions en utilisant les principes de l'ingénierie pour assembler des parties biologiques fonctionnelles (Andrianantoandro *et al.*, 2006). Comme exemple, le principe des ordinateurs et circuits logiques en électronique a été adopté par les biologistes pour créer des '*biocomputers*'. Ceci a commencé par Leonard Adelman en 1994 *in vitro* par '*DNA computing*' pour régler un problème mathématique nommé le '*seven-point hamiltonian path*'. (Adleman, 1994)

La première application *in vivo* a été faite dans *E. coli* en 1998 (Sussman, 1998) et a été suivi du développement d'un ordinateur biologique conçu pour le contrôle de l'expression génique dans les cellules cancéreuses (Benenson *et al.*, 2004). Un autre exemple très utilisé sont les 'biosenseurs' qui sont des organismes génétiquement modifiés, généralement des bactéries, pour détecter la présence d'une molécule spécifique et émettre un signal quantifiable comme une fluorescence.

- **Utilisation :**

Au début, l'interaction entre l'ADN et les protéines étaient la base utilisée pour contrôler la transcription à l'aide des circuits logiques, mais la découverte de l'activité catalytique des ARN avec leurs rôles de messenger et de régulateurs a fait que ces derniers sont devenus un bon outil d'ingénierie pour développer des systèmes basés essentiellement sur l'ARN. Ceci est dû à la capacité de l'ARN à interagir avec d'autres molécules (des protéines, métabolites et des acides nucléiques), et cela est permis par une structure spécifique à chaque ARN (Isaacs *et al.*, 2006).

Selon leur fonction, les ARN sont divisés en trois catégories: 1-senseur : capable de détecter la présence d'un certain signal soit thermique soit moléculaire, 2-les ARN actionnaires qui effectuent la régulation et 3-les transmetteurs qui convertissent le signal (Win *et al.*, 2009).

Pour développer ces systèmes, il y a généralement une combinaison de plusieurs ARN, soit de même type, comme la combinaison de trois ribozymes en tête de marteau contre la survivin pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses (Fei *et al.*, 2008), soit des ARN différents pour former par exemple 'un ribozyme allostérique' nommé 'aptazyme' qui est un ribozyme (en tête de marteau généralement) fusionné à un aptamère d'ARN. De tels modèles ont été conçus par Win and Smolke 2007 et peuvent répondre à des signaux intra ou extracellulaires pour effectuer les opérations logiques : ET, OU, NON-OU et NON-ET (Win & Smolke, 2007) ; (Shapiro & Gil, 2008) (Figure 1.27) .

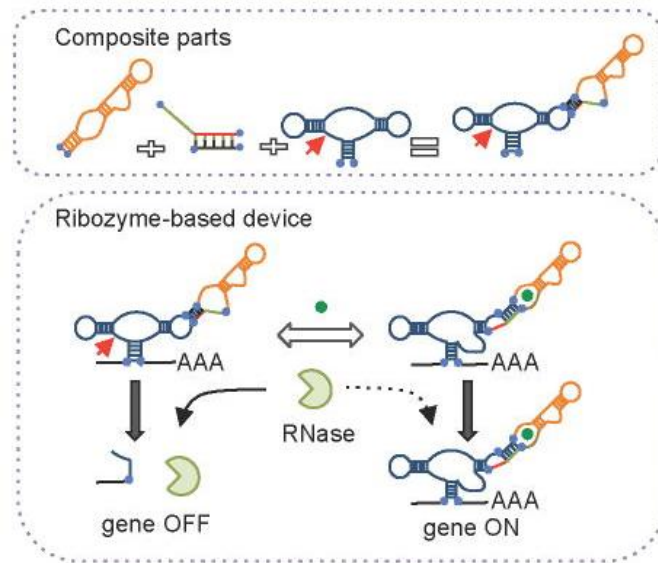


Figure 1.27: Structure d'un ribozyme allostérique.

Le dispositif est formé par un aptamère (en orange), un ribozyme en tête de marteau (en bleu) et un *linker* permettant le déplacement d'un brin du ribozyme. En absence du ligand le ribozyme a sa structure active et il effectue la réaction de clivage ce qui empêche la transcription du gène en amont. Quand l'aptamère lie le ligand le changement de sa conformation change l'emplacement du *linker* causant la perte de la structure active du ribozyme. Tiré de (Win *et al.*, 2009).

La diversité des ARN et la capacité de faire des combinaisons a permis la mise en place de nouvelles classes d'ARN régulateurs synthétiques comme l'antiswitch qui est l'assemblage d'un aptamère et d'un domaine anti-sens en créant un switch ON ou OFF dépendamment de la présence ou l'absence du ligand de l'aptamère (Bayer & Smolke, 2005; Isaacs *et al.*, 2006) (Figure 1.28).

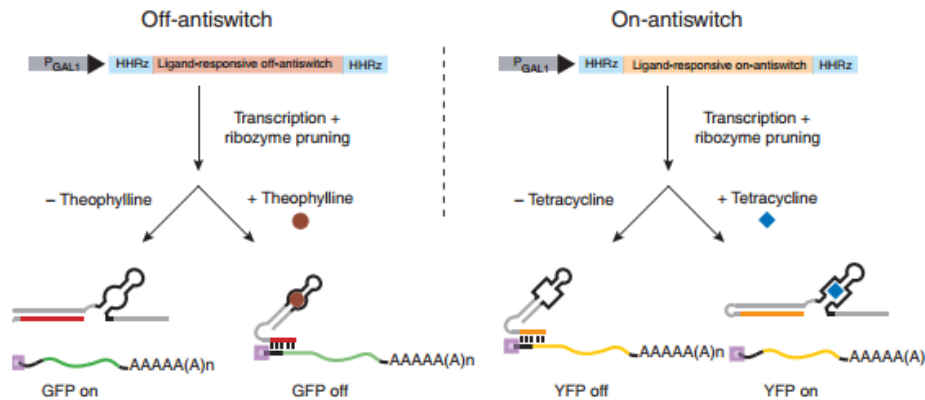


Figure1.28: Structure d'un anti-switch.

L'outil est composé par un aptamère auquel un domaine anti-sens est rajouté et le changement de la conformation de l'aptamère lors de la liaison de son ligand spécifique peut soit activer, soit inhiber la traduction de l'ARNm. Tiré de (Isaacs, Dwyer, and Collins 2006).

1.5.4. Application des fonctions logiques en biologie :

Dans un système biologique, les valeurs 'Vrai' et 'Faux' ne sont pas nécessairement l'absence ou la présence, généralement une certaine concentration d'une molécule est utilisée comme le seuil qui fait la différence entre le 0 et le 1, sinon c'est l'état d'une protéine qui est soit activée, soit inhibée qui est utilisée. Les portes logiques en biologie sont faites par une combinaison de plusieurs éléments moléculaires dans la cellule pour agir par activation ou inhibition sur des régulateurs qui peuvent être le résultat final où c'est eux qui effectueront la dernière étape aboutissant à la sortie attendue (Benenson, 2009).

1.6. Conception des ARN synthétiques :

Les ARN noncodants naturels utilisés pour la régulation génique servent aussi au développement d'outils en biologie synthétique, notamment dans le cadre de circuits logiques. Les ARN synthétiques constituent une source importante de nouveaux outils dans ce domaine.

1.6.1. Les difficultés liées à la conception :

La conception de ces ARN est relativement difficile due à la dépendance de leurs fonctions à leurs structures tertiaires qui, en plus des paires de bases canoniques et des appariements wobbles, incluent des paires de bases non-canoniques formant des structures complexes (Laing & Schlick, 2011). Ainsi, la mise en place des programmes *in silico* en vue de prédire les séquences et les structures secondaires et tertiaires des ARN est devenu une nécessité pour faciliter leur application dans le domaine de biologie synthétique (ou de l'ingénierie d'ARN).

La conception des ARN est faite d'une façon rationnelle et dépendante de conditions souhaitées, le but est généralement d'obtenir une nouvelle séquence d'ARN qui se replie en une structure secondaire déterminée en se basant sur les lois de la thermodynamique pour calculer l'énergie libre (la température de fusion et l'énergie libre de Gibbs) de la structure attendue et la température de fusion résultant de l'appariement des nucléotides repliés. Pour obtenir les meilleures séquences grâce à un logiciel, deux méthodes de conception sont utilisées :

- La conception positive : pour sélectionner les candidats qui répondent aux conditions fixés par le développeur ou l'utilisateur.
- La conception négative : pour éliminer les séquences non-spécifiques.

Un logiciel réussi génère donc des séquences présentant une haute affinité et une haute spécificité (Dirks *et al.*, 2004).

Dans ce projet nous avons eu recours à deux logiciels de conceptions d'ARN pour générer les séquences de ribozymes synthétiques que nous avons utilisé : Ribosoft et Enzymer.

1.6.2. Ribosoft :

Ribosoft est un service web disponible sur internet, il permet la conception des ribozymes en tête de marteau qui fonctionnent en *trans* c'est-à-dire qui peuvent cliver d'autre ARN. En fait, la façon avec laquelle Ribosoft conçoit des ribozymes est la méthode classique c'est-à-dire en gardant la séquence consensus du ribozyme formant le cœur catalytique et la tige II, mais les séquences des tiges I et III sont conçues pour être complémentaires à la séquence de la cible de part et d'autre du site de clivage (GUC dans ce projet) (Kharma *et al.*, 2016) (Figure 1.29).

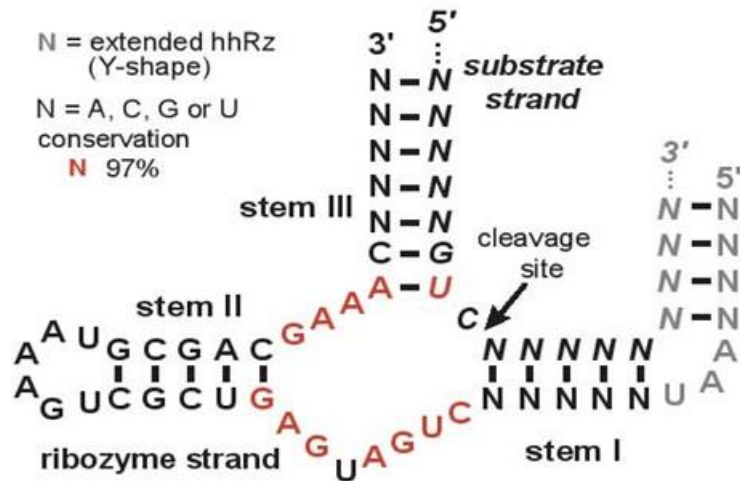


Figure 1.29: Structure secondaire du ribozyme en tête de marteau.

Les séquences du cœur catalytique et de la tige II sont conservées et celles des tiges I et III sont conçues par complémentarités à la cible présentée ici par le '*substrate strand*'. Tiré de (Kharma *et al.*, 2016).

Pour l'utilisateur, la conception passe par quelques étapes (Kharma *et al.*, 2016) :

-La première est de mettre la séquence de l'ARN cible, le numéro d'accèsion du gène dans la banque de données NCBI ou joindre un fichier contenant la séquence (format FASTA) (Figure 1.30).

-La deuxième étape est de choisir des paramètres liés à l'expérience à faire, comme la température et l'environnement de la réaction, la concentration de Mg^{2+} et Na^+ , le site de clivage (ex. GUC) et la structure du ribozyme qui est soit minimale, soit complète (Figure 1.31).

-Le résultat est une liste de ribozymes conçus avec différents paramètres importants comme l'accessibilité 1 et 2 et le '*shape quality*' qui ont des valeurs allant de 0 à 1 où plus la valeur est proche de 1 plus le ribozyme est supposé être plus efficace (Figure 1.32).

La conception des ribozymes passe aussi par plusieurs étapes en commençant par la recherche des sites de clivage dans la séquence cible, suivie de la génération des séquences des ribozymes pouvant cibler ces sites et qui représentent une complémentarité parfaite avec l'ARN choisi. Ensuite, la température d'hybridation (T_m) entre les brins des tiges I et III et la cible est calculée pour chaque séquence candidate de ribozyme. A cette étape commence le criblage pour avoir des ribozymes qui :

- Ont des brins des tiges I et III qui ne sont pas trop courts car ceci diminue la spécificité du ribozyme car il peut se lier à n'importe quel ARN qui a la même petite séquence complémentaire à ces brins.

- N'ont pas des brins des tiges I et III trop longs, car cela inhiberait le 'turnover' des ribozymes, c'est-à-dire qu'un seul ribozyme va s'hybrider par complémentarité de séquence sur un seul ARN cible pour le couper mais il restera collé dessus au lieu d'être capable de se dissocier et cliver d'autres ARN cible.

Les ribozymes ayant une T_m adéquate passent à l'étape de criblage selon la structure. Ribosoft utilise le programme 'Sfold' qui fait la prédiction des structures secondaires, afin de générer 10 structures pour chaque ribozyme. Après, Ribosoft prend en considération l'énergie nécessaire à la dénaturation, de façon à avoir des candidats avec des structures optimales pour permettre de s'hybrider à la cible. Ainsi, les ribozymes ayant plus d'accessibilité à la cible sont choisis et ceci dépend : d'une part de l'accessibilité du site de clivage et des séquences flanquant la région à laquelle le ribozyme va s'hybrider, et d'autre part du repliement des brins du ribozyme sur eux-mêmes, les brins correspondant aux tiges I et III doivent être simples brins pour avoir une meilleure hybridation avec la cible et donc une meilleure activité de clivage.

Ainsi, la page des résultats n'affiche que les séquences ayant passés les filtres suite aux calculs de tous les paramètres. L'ensemble de ces paramètres assigne chaque ribozyme à un rang différent : ceux qui ont les meilleures valeurs gagnent le rang '1' et les autres ont des rangs différents (Kharma *et al.*, 2016).



The image shows the Ribosoft website interface. At the top left is the Ribosoft logo, which consists of a stylized orange and black structure resembling a ribozyme. To the right of the logo are navigation links: 'Home', 'License', and 'API'. Below the logo, the page is titled 'Step 1 - Selecting the sequence'. There are two main options for entering a sequence: 1) 'Search for sequence number. You may also find your sequence here' with a text input field containing '(example: M73307)' and a 'Search' button. 2) 'Or Select a file with your sequence to upload. (TXT or FASTA format)' with a 'Select File' button. Below these options is a large text area labeled 'Paste your sequence here...'. At the bottom right of the form is a blue 'Submit' button.

Figure 1.30: Première étape pour Ribosoft

Step 2 - Design Options

Please select the options that will be applied during the design of the ribozyme.

Regions for Target Design ?

5'UTR
 Open Reading Frame (ORF)
 3'UTR

Target Environment ?

In-vitro
 In-vivo
Human ▼

Environment Properties ?

Temperature
37 ▲▼ °C

Na⁺ Concentration
150 ▲▼ mM

Mg²⁺ Concentration
0 ▲▼ mM

Oligomer Concentration
200 ▲▼ nM

Potential Cut-sites ?

Preferred cut-site(s)

GUC
CUC
AUC
UUC
.....

Ribozyme Shape ?

Minimal (before 2003)
 Wishbone (discovered in 2003)

Advanced Options - Arms Length ?

Figure1.31: Deuxième étape.

Design Option	Value
Sequence Length	371
Target Region	3', ORF, 5'
Target Environment	In-vivo
Temperature	37 °C
Na ⁺ Concentration	150 mM
Mg ²⁺ Concentration	1 mM
Oligomer Concentration	200 mM
Cut-sites	GUC
Fold Shape	Basic
Helix I Length	[5, 10]
Helix III Length	[5, 10]
T7 promoter used?	No
Specificity	Cleavage only

Figure 1.32: Troisième étape : résumé des conditions de l'expérimentation

Design Results

Show entries Filter by Cut-site Number:

Cut-site Number	Sequence	Melting Temperature (Left) (°C)	Melting Temperature (Right) (°C)	Accessibility 1	Accessibility 2	Ribozyme Shape Quality	Weighted off-target hits	Overall Rank
GUC4	CAUGCUGCUCUGAU GAGGCCGAAAGGCC GAAACUCUUUCUG	32.97	32.97	1	1	1	2.94	1
GUC4	CAUGCUGCUCUGAU GAGGCCGAAAGGCC GAAACUCUUUCUGC	32.97	36.97	0.994	1	0.626	2.94	1
GUC3	UGAUCCACUCUGAU GAGGCCGAAAGGCC GAAACUGGCCUAGG	30.97	40.97	0	0.653	0.59	8.58	1
GUC3	UGAUCCACUCUGAU GAGGCCGAAAGGCC GAAACUGGCCU	30.97	30.97	0.018	0.653	0.771	8.58	2
GUC3	UGAUCCACUCUGAU GAGGCCGAAAGGCC GAAACUGGCCUA	30.97	32.97	0.015	0.653	0.522	8.58	2

Figure 1.33: Résultats donnés par Ribosoft.

Tiré de (Kharm et al., 2016)

1.6.3. Enzymer :

« Enzymer » est un service web développé pour la conception d'ARN ayant des structures secondaires connues en utilisant l'approche de 'inverse folding', permettant de générer une séquence à partir d'une structure secondaire déterminée et non à partir d'une séquence. En effet, l'algorithme passe par trois étapes qui commencent par la génération d'une séquence aléatoire qui correspond à l'entrée de l'algorithme. Après, des mutations sont faites dans la séquence jusqu'à l'obtention de séquences qui se replient conformément à la structure secondaire désirée et qui ont les valeurs des paramètres qui donne une meilleure stabilité à la structure, c'est-à-dire qu'ils répondent aux valeurs entrées par l'utilisateur au début. Ces paramètres sont l'énergie libre qui est une mesure qui représente la thermostabilité de la structure formée par cette séquence et la fonction de partition qui désigne un équilibre des paires de bases qui peuvent se former dans la structure de l'ARN (les détails sont dans la Figure 1.34).

Ce qui est différent dans enzymer par rapport aux programmes utilisant l'approche de 'inverse folding' existants, c'est qu'il prend en considération les pseudonoeuds qui sont un motif de structure tertiaire nécessaire pour la stabilité de la structure fonctionnelle de nombreux ARN (zandi et al 2016), comme dans le cas de certains ribozymes en tête de marteaux et des *riboswitchs* SAM I. Donc l'algorithme utilise une stratégie permettant de faire la différence entre une topologie classique n'ayant que des tiges-boucles et une topologie qui inclut différents types de pseudonoeuds (Zandi et al., 2016).

Comme entrée à l'algorithme, la séquence est écrite de deux façons :

```
1-oooooooo ooooooooo CUGAUG Aoo ooooooooo ooooooooo AG GAG AA Aoooooooo AUG
2-..... (((((( . . . . . ((( . . . . . [ [ [ [ [ [ [ . . ] ] ] ] ] ] . . (((((( . . . . .
GCUUCGU C GGAAGACG TTATCAA GA
) ) ) ) ) ) . ) ) ) ) ) ) [ ] ] ] ] ] ] . .
```

En '1' les 'o' sont les bases non conservées dans la séquence et c'est au programme de les déterminer.

La deuxième forme c'est l'annotation qui indique le type d'interaction dans lequel chaque nucléotide est inclus où :

- . : Une base libre, simple brin, non incluse dans une paire de base
- () : Une paire de bases d'une tige-boucle (inclut aussi les tiges avec des jonctions multi-tiges)
- [] : Deux bases incluses dans un pseudonoeud

Et le résultat est une panoplie de séquences qui passe par des filtres pour choisir les meilleures au final (Zandi *et al.*, 2016).

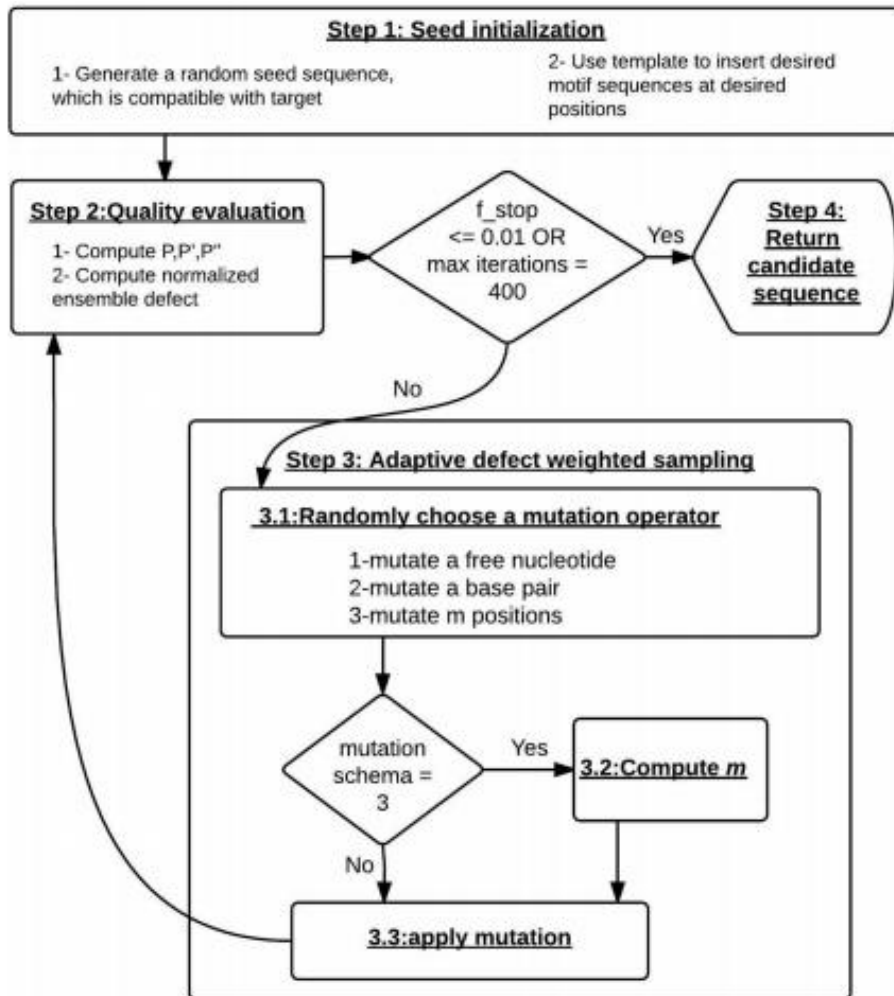


Figure1.34: Etapes de conception par enzymier.

La conception commence par la génération des séquences aléatoires en se basant sur la séquence matrice pour insérer les motifs de la structure secondaire aux positions convenables. Pour la deuxième étape la qualité de la séquence est évaluée par le calcul des paramètres fixés par l'utilisateur, si la séquence rencontre les conditions nécessaires elle sera retournée, sinon elle passe à la troisième étape. La troisième étape consiste à la génération des mutations des nucléotides, des paires de bases et de leurs positions jusqu'à l'obtention des mutations qui répondent aux conditions désirés pour obtenir la structure cible. Tiré de (Zandi *et al.*, 2016).

2 PROBLÉMATIQUES, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS :

La biologie synthétique dépend du développement de nouveaux outils en biologie pour le contrôle de l'expression génique chez les organismes vivants, allant des bactéries à l'être humain, dans le but d'améliorer la vie des humains. Entre autres, l'ingénierie des ARN montre un grand potentiel. L'ARN est connu pour des rôles de régulateurs utilisant des mécanismes d'action variés qui dépendent de structures secondaires complexes. En conséquence, les développements futurs bénéficieraient grandement du développement de logiciels pour faciliter la tâche de la conception des nouveaux ARN synthétiques avec des fonctions déjà connues ou de nouvelles fonctions.

Dans ce projet nous avons eu recours à deux nouveaux outils bio-informatiques :

- **Ribosoft** : un service web disponible gratuitement sur internet pour faire la conception des ribozymes en tête de marteau.
- **Enzymer** : un algorithme disponible sur internet aussi qui permet la génération de nouveaux ARN en se basant sur la structure secondaire d'un ARN connus, ceci en utilisant l'approche de '*inverse folding*'.

Ainsi, en utilisant Ribosoft et Enzymer nous émettons l'hypothèse qu'il sera possible de trouver des méthodes efficaces pour contrôler l'expression d'un gène donné. D'une part en utilisant des circuits logiques (ET, OU et XOR) formés par des ribozymes en tête de marteau dont la transcription est contrôlée par des *riboswitchs* et qui cible RFP en *trans*. D'autre part, en incluant le ribozyme en tête de marteau dans la séquence codante du gène.

Pour valider nos hypothèses nous avons fixé comme objectifs de :

- 1- Tester les ARN générés par les deux programmes Ribosoft et Enzymer sont fonctionnels : en testant des ribozymes actifs en *trans* conçus par Ribosoft et d'autres actifs en *cis* produits par Enzymer, à la fois *in vitro* et *in vivo*.
- 2- Contrôler l'activité d'un ribozyme par un *riboswitch* : par l'ajout d'une séquence d'un *riboswitch* connu devant un ribozyme synthétique dont l'activité et la spécificité sont déjà prouvées.
- 3- Valider la fonctionnalité des opérations logiques : en testant les opérations ET, OU et XOR avec des ribozymes contrôlés par des *riboswitchs* différents pour être validés, alors que pour l'opération XOR l'utilisation de deux ribozymes modifiés seulement permettra de prouver *in vitro* la faisabilité de l'opérateur XOR.

4- Contrôler l'expression d'un gène par un ribozyme chevauchant la séquence codante :

Le ribozyme va conserver la structure secondaire du ribozyme en tête de marteau et la séquence contiendra deux parties : une partie appartenant au ribozyme et une partie de la séquence codante d'un gène désiré mais tout en conservant la séquence du cœur catalytique du ribozyme.

Pour atteindre ces buts nous allons procéder comme suit :

-La conception des ribozymes synthétiques par les nouveaux programmes : les ribozymes actifs en *trans* seront générés par Ribosoft et Enzymer conçoit ceux actifs en *cis*.

-L'essai de l'activité des ribozymes *in vitro* : parmi les ribozymes engendrés quelques-uns seront choisis pour être amplifiés, transcrits et finalement mis dans des conditions semblables aux conditions physiologiques. Pour les ribozymes actifs en *cis* chacun est mis seul mais ceux actifs en *trans* seront mis en présence de leur ARN cible.

-Pour les ribozymes générés par Ribosoft deux ribozymes seront choisis pour effectuer l'opération XOR et deux autres seront assemblés chaque à un *riboswitch* pour essayer les opérations ET et OU.

-Le test des ribozymes *in vivo* : si les ribozymes prouvent qu'ils sont actifs *in vitro*, deux cas se présentent :

- ✓ Les ribozymes conçus par Ribosoft seront testé au début chacun seul sans *riboswitch*, puis chacun en présence du *riboswitch* et finalement les deux ensembles '*riboswitch*+ribozyme'.
- ✓ Dans le cas du programme Enzymer c'est les ribozymes inclus dans la séquence codante d'un gène qui seront testé *in vivo*.

En effet, les principes à prouver dans ce projet peuvent servir à plusieurs applications comme le développement des biosenseurs qui détectent deux ou plusieurs molécules ensemble dans le même milieu. Ceci peut être fait en utilisant une seule opération logique comme le 'ET' ou en combinant différentes opérations pour répondre à diverses conditions. Par exemple dans un milieu X nous voulons détecter exclusivement la molécule A OU la molécule B et NON la molécule C donc c'est en répondant à ces conditions qu'un seul signal sera émis à la fin. En fait ces opérations peuvent être appliquées dans l'environnement, pour des diagnostics médicaux et même pour développer des thérapies géniques en ayant un système qui en même temps détectent le taux de certaines molécules et qui donne une réponse dépendamment de cela. En fait, à l'aide des aptamères ou des *riboswitchs* le taux de l'expression d'une molécule peut être détecté et selon cette expression la transcription des ribozymes sera, soit inhibée,

soit ils seront exprimés pour aller dégrader des gènes d'intérêt qui sont inclus dans une maladie qui peut être guérit ou apaiser en les détruisant.

3 MATERIELS ET METHODES :

Pour construire un circuit logique (Figure 3.1, 3.2 et 3.3) nous avons besoin de trois composantes qui sont :

- Les *riboswitchs* jouant le rôle de senseur et transducteur de signal
- les ribozymes qui sont les effecteurs du circuit
- le RFP qui sera utilisé comme signal final.

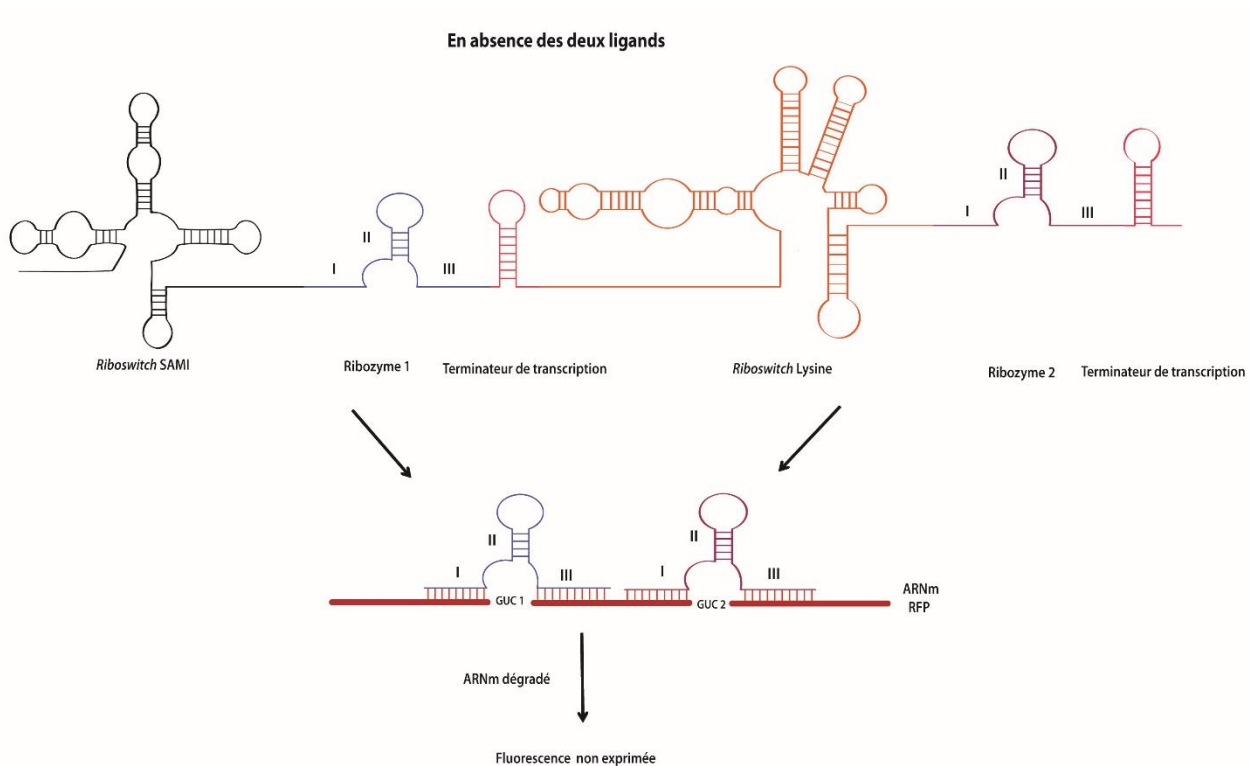


Figure 3.1 : circuit logique formée d'ARN

Le circuit est formé par deux *riboswitchs* (les senseurs et transducteurs du signal) ; le *riboswitch* SAM I et le *riboswitch* Lysine qui contrôlent la transcription de deux ribozymes en tête de marteau (1 et 2) (les effecteurs du circuit) qui ciblent deux sites différents de l'ARNm de RFP (GUC1 et GUC2) en s'hybridant à l'ARNm à l'aide des tiges I et III pour ensuite dégrader l'ARNm. En prenant comme exemple la fonction logique ET dans cette figure : En absence du SAM et de la lysine les deux *riboswitchs* permettront la transcription des deux ribozymes qui vont dégrader l'ARNm de RFP ce qui empêche alors l'expression de la fluorescence

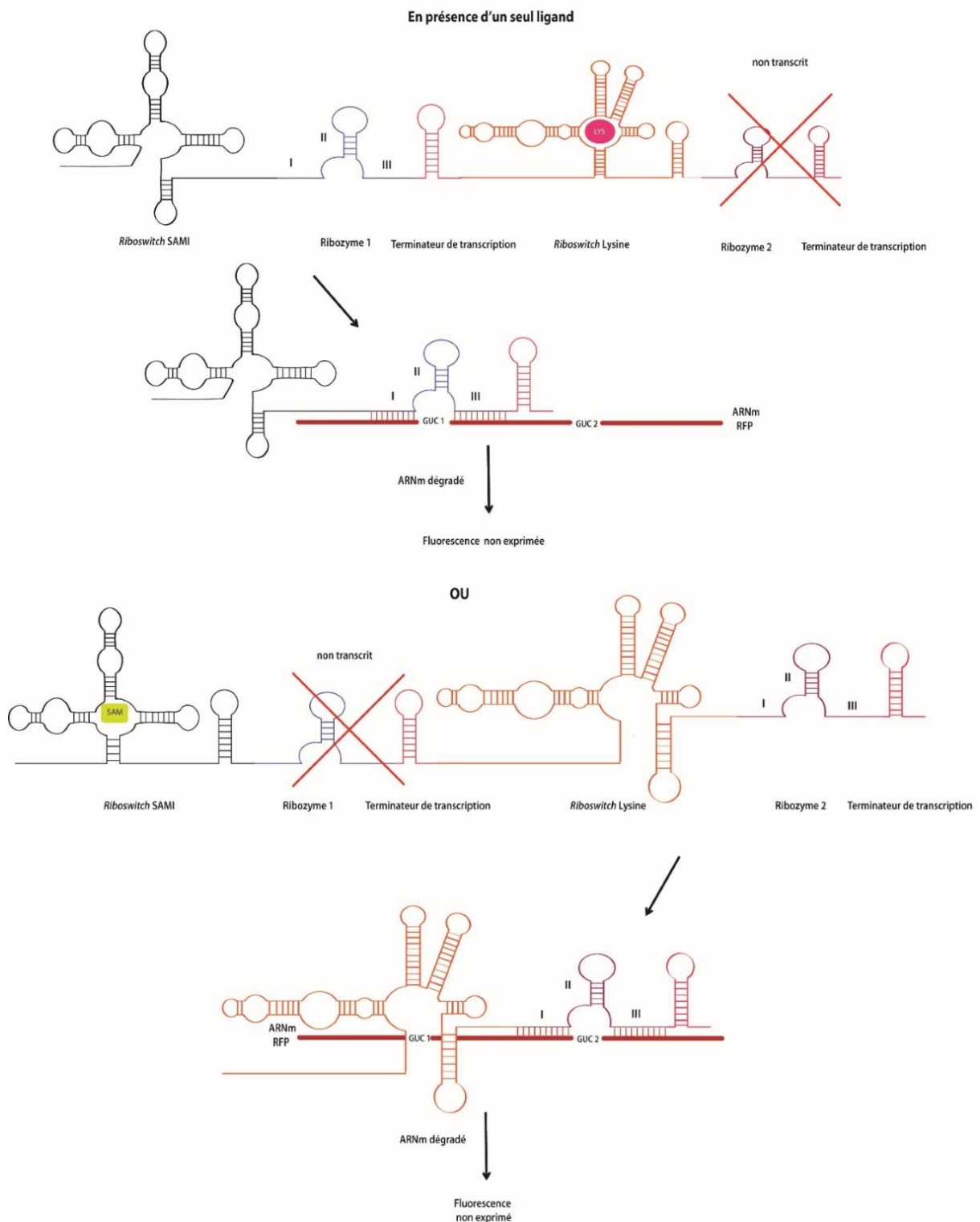


Figure 3.2 : Le circuit logique en présence d'un seul ligand.

Pour le même circuit décrit dans la figure 31, en présence de SAM, le *riboswitch* SAM I va former un terminateur de transcription qui bloque la transcription du ribozyme 1, mais tant que la Lysine est absente, le *riboswitch* Lysine forme un anti-terminateur ce qui permet la transcription du ribozyme 2 qui dégradera l'ARNm de RFP. Et c'est le cas inverse en absence du SAM et en présence de la lysine, c'est le ribozyme 1 qui dégradera le RFP alors que le ribozyme 2 ne sera pas transcrit.

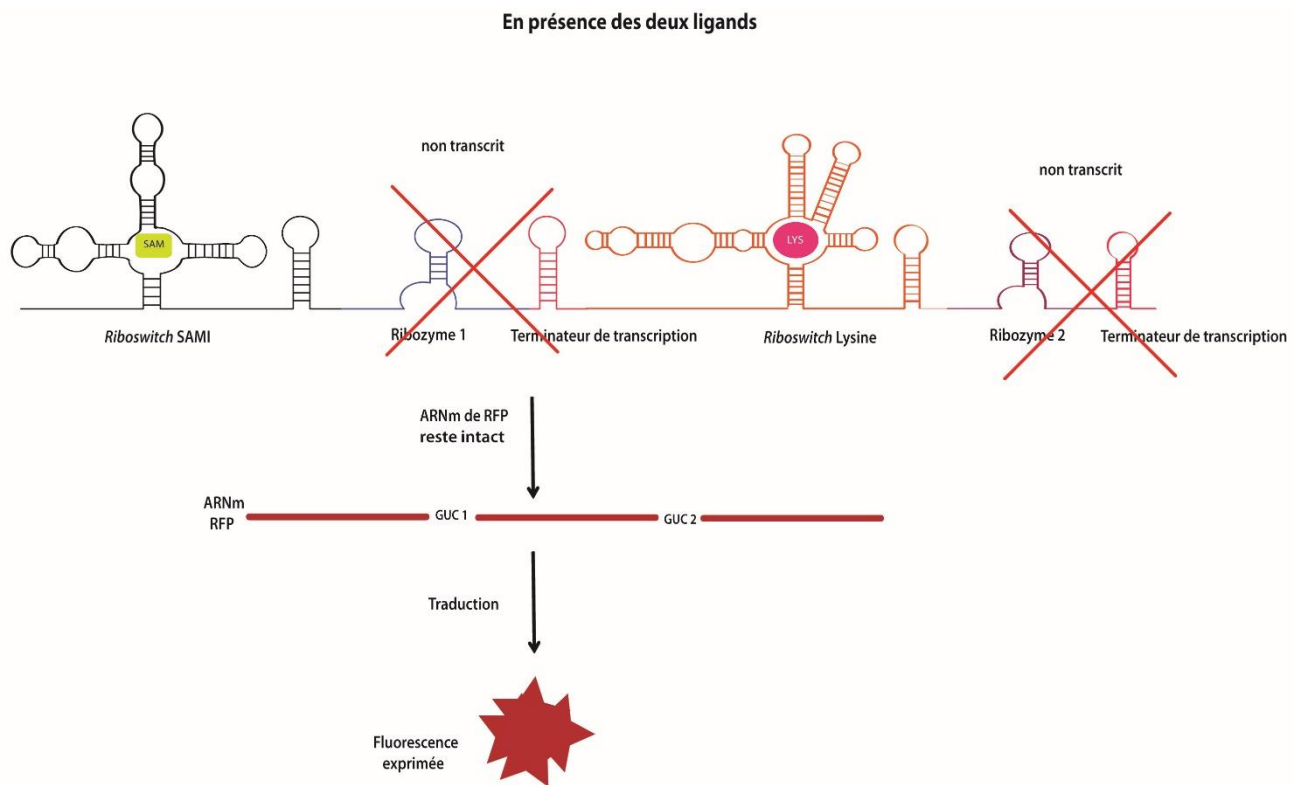


Figure 3.3 : Le circuit en présence des deux ligands.

Le seul cas où la RFP sera exprimé dans le circuit décrit dans la figure 3.1 est lorsque les deux ligands (SAM et Lysine) sont présents permettant au deux *riboswitchs* de former des terminateurs de transcription en empêchant alors la transcription des deux ribozymes, donc l'ARNm de RFP reste intact et la fluorescence sera exprimée.

3.1. Les ribozymes conçus par Ribosoft :

Pour commencer, il fallait confirmer l'activité de chacune des composantes *in vitro*. Pour prouver que 'Ribosoft' est un outil fonctionnel, nous avons choisi comme cible l'ARNm de la protéine fluorescente en rouge (RFP) pour faciliter la détection des résultats des tests *in vivo*.

Le premier but était de tester l'activité des ribozymes conçus par 'Ribosoft' pour valider l'efficacité du service web et pour choisir finalement les meilleurs ribozymes afin de les utiliser dans le développement du circuit logique. La séquence d'ADN de RFP a été entrée dans Ribosoft ainsi que les conditions choisies de l'expérience (Figure 1.30, 1.31). Ribosoft a généré plus de 100 ribozymes parmi lesquels 14 ont été choisis (tableau 9).

3.1.1. Amplification des ribozymes et de leurs cibles :

- **Amplification des ADN des ribozymes :**

La PCR sert à amplifier les ADN *in vitro* pour pouvoir les utiliser comme matrice pour les réactions de transcription *in vitro*. Cette PCR ainsi que toutes les autres PCR du projet ont été faites dans le thermocycleur 'C1000 touch-thermal cyler Bio-Rad'.

Afin de pouvoir transcrire les ribozymes, la séquence du promoteur T7 a été rajoutée aux amorces de chacun des ribozymes (Tableau 9).

Pour vérifier la spécificité des ribozymes générés par Ribosoft, de nouveaux ribozymes ont été conçus pour une portion de l'ARN 16S de la bactérie *Microcystis aeruginosa* NIES 298 (tableau 10) et ils étaient testés sur la portion de l'ARN 16S et sur l'ARN de RFP. Donc des ribozymes contre deux cibles ont été amplifiés : l'ARN de RFP et la portion de l'ARN 16S.

Tableau 9: Séquences des ribozymes testés contre RFP

nom	Type	Séquence
Rz A 2 (1)	ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGACCTTCTAAGTACGCTGATGAGTCGCTG AAATGCGACGAAACGACCTTCA
Rz A 7 (1)	ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGTCTGCATTAAAACCGCTGATGAGTCGCT GAAATGCGACGAAACCGTCCGACG
Rz A 9 (4)	ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGGCGTCTAAGTAGTCTGATGAGTCGCTGA AATGCGACGAAACCCACCGTCTT
Rz 2 (4)	ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGGTACCTTCTAAGTACGCTGATGAGTCGC TGAAATGCGACGAAACGACCCA
Rz 4 (1)	ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGCTGGAACTAAGCGGGCTGATGAGTCGCT GAAATGCGACGAAACAGGATG
Rz 4 (6)	ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGGAACTTAAGCGGGCTGATGAGTCGCTGA AATGCGACGAAACAGGATGT
Rz 5 (4)	ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGCTTCCGTAAGGAAGCTGATGAGTCGCTG AAATGCGACGAAACAGTTTCA
Rz 5 (m)	ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGGCAATCCGTAAGGAAGCTGATGAGTCGC TGAAATGCGACGAAACAGTTTC
Rz 7 (1)	ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGTCTGCATTAAAACCGCTGATGAGTCGC TGAAATGCGACGAAACCGTCCGACG
Rz 7 (4)	ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGTTTCTGCATTAAAACCGCTGATGAGTCG CTGAAATGCGACGAAACCGTCCG
Rz 9 (1)	ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGAGCGTCTAAGTAGTCTGATGAGTCGCTG AAATGCGACGAAACCCACCGTCT
Rz 9 (7)	ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGGCGTCTAAGTAGTCTGATGAGTCGCTGA AATGCGACGAAACCCACCGU
Rz 11 (1)	ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGAGCACCGGTTAAGGAGTCTGATGAGTCG CTGAAATGCGACGAAACGACCTTC
Rz 11 (5)	ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGCCGGTTAAGGAGTCTGATGAGTCGCTGA AATGCGACGAAACGACCTTC
T7	Amorce	TAATACGACTCACTATAGCG

Tableau 10 : Séquences des ribozymes testés contre la portion de l'ARN 16S

Rz 3 (1)	Ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGACAATTAACCAAACTGAT GAGTCGCTGAAATGCGACGAAACCTTCCT
Rz 7 (5)	Ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGAGCAACCTTAAGATTTCT GATGAGTCGCTGAAATGCGACGAAACAGCAGACTT
Rz 7 (m)	Ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGTTAACCTTAAGATTTCTG ATGAGTCGCTGAAATGCGACGAAACAAGCTGACTT

Légende : « ribozyme », les séquences des amplicons d'ADN ayant servi à amplifier les ribozymes qui coupent l'ARN du RFP ou du 16S en différents sites. Code des couleurs : gris pour la séquence de tige I qui s'hybride en 3' sur la séquence cible, vert pour la séquence de la tige III qui s'hybride en 5' sur l'ARN cible, jaune indique la séquence du cœur catalytique, bleu montre la séquence de la tige II et rouge montre les mutations. Les oligonucléotides utilisés pour amplifier ces ribozymes sont les séquences complémentaires. La séquence du promoteur T7 est indiquée en gras, suivis des nucléotides GCG pour permettre une initiation de transcription efficace.

Les oligonucléotides des ribozymes et de l'amorce ont été commandés de la compagnie BioCorp DNA Inc. Chaque réaction de PCR est faite dans un volume final de 100 µL contenant : 1 U de la taq ADN polymérase (NEB), son tampon 1X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, pH 8.3), 2 mM de dNTP, l'amorce T7 à 50 nM, l'ADN matrice à 50 nM, et le volume est complété par de l'eau milliQ stérile.

La PCR des ribozymes a été faite selon les étapes suivantes pendant 20 cycles (les étapes 2 à 4 sont répétées) :

- 1-Dénaturation à 95 °C pendant 3 min
- 2-Deuxième dénaturation à 95 ° C pendant 30 secondes
- 3-Hybridation pendant 30 secondes à 49°C.
- 4-Première élongation à 72 °C pendant 30 secondes
- 5-Elongation finale à 72 °C pendant 5 min.

- **Préparation des cibles :**

L'ADN de RFP (Figure 3.5) a d'abord été amplifié à partir du plasmide pSB1C3 BBa_E1010 (Biobricks) (Figure 3.4), mais un autre plasmide a ensuite été utilisé comme matrice, pSEVA3b67Rb (Figure 3.12) (commandé de Addgene, ce plasmide a été construit par le laboratoire de Tom Ellis) (Wright *et al.*, 2015).

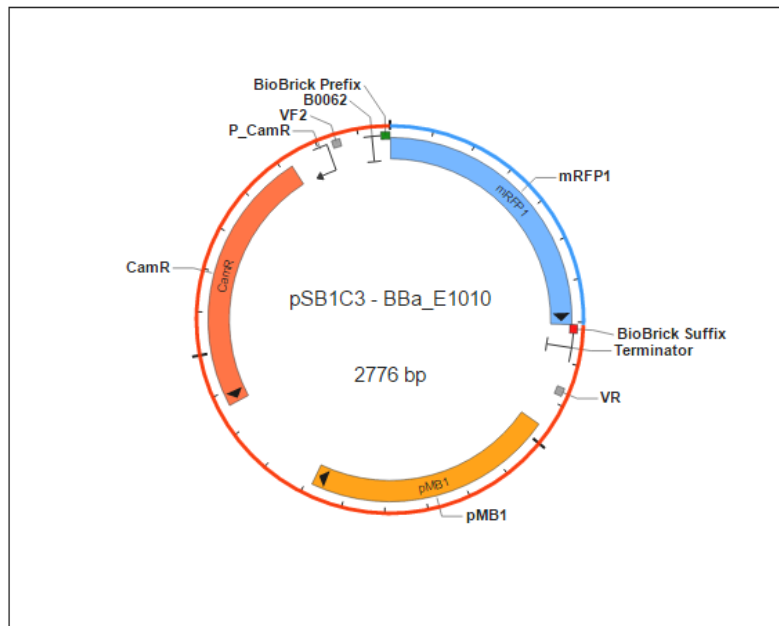


Figure 3.4: plasmide pSB1C3 BBa_1010

CamR est le gène de résistance au chloramphénicol, mRFP1 est le gène qui code pour la RFP pris du génome de *Discosoma striata* et Pmb1 est l'origine de répllication.

Chaque réaction de PCR est faite dans un volume final de 100 μ L contenant : le tampon de la taq polymérase 1 X (NEB), 2 mM des dNTPs, les amorces sens (F RFP) et anti-sens (R RFP) (BioCorp DNA Inc) (tableau 11) à 2 μ M, 2nM de l'ADN matrice, 1U de la taq ADN polymérase (NEB) et de H₂O stérile. Dans quelques réactions, le tampon du « GC enhancer » 1X (80mM Tris-SO₄ pH 9.2, 20mM (NH₄)₂SO₄, 5% glycérol, 5% DMSO, 0.06% (octylphenoxy)polyethoxyethanol) IGEPAL CA-630, 0.05% Tween 20) et le GC enhancer 1X (10 mM Tris-HCl, 25% DMSO, 25% glycérol, pH 9.2) ont été ajoutés. Ces deux tampons viennent avec la OneTaq Hot Start ADN polymérase et ils aident à la dénaturation de l'ADN pour les matrices d'ADN difficiles à amplifier. Cette PCR a été faite suivant les étapes suivantes pour 35 cycles (étapes 2 à 4).

- 1-Dénaturation à 95 °C pendant 5 min
- 2-Deuxième dénaturation 95 °C pendant 30 secondes
- 3-Hybridation pendant 1 min à 51.3 °C.
- 4-Première élongation à 72 °C pendant 1 min.
- 5-Elongation finale à 72 °C pendant 5 min.

5' TAATACGACTCACTATAGCGTCTAGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGGCTTCCTCCGAA
GACGTTATCAAAGAGTTCATGCGTTTCAAAGTTCGTATGGAAGGTTCCGTTAACGGTCACGA
GTTTCGAAATCGAAGGTGAAGGTGAAGGTTGAAGGTCGTCGTCGTACGAAGGTACCCAGACCGCTAAACTGA
AAGTTACCAAAGGTGGTCCGCTGCCGTTTCGCTTGGGACATCCTGTCCTCCGCAGTTCCAGTAC
GGTTCCAAAGCTTACGTAAACACCCGGCTGACATCCCGGACTACC TGAAACTGTCCTTCCC
GGAAGGTTTCAAATGGGAACGTGTTATGAACTTCGAAGACGGTGGTGTGTTACCGTTACCC
AGGACTCCTCCCTGCAAGACGGTGAAGTTCATCTACAAAGTTAAACTGCGTGGTACCAACTTC
C CGTCCGACGGTTCGGTTATGCAGAAAAAACCATGGGTTGGGAAGCTTCCACCGAACGTAT
GTACCCGGAAGACGGTGTCTCTGAAAGGTGAAATCAAATGCGTCTGAAACTGAAAGACGGTG
GTCACTACGACGCTGAAGTTAAAACCACCTACATGGCTAAAAAACCGGTTTCAGCTGCCGGT
GCTTACAAAACCGACATCAAACCTGGACATCACCTCCCACAACGAAGACTACACCATCGTTGA
ACAGTACGAACGTGCT GAAGGTCGTCACTCCACCGGTGCTTAATAA3'

Figure 3.5 : La séquence du RFP

Code des couleurs : rouge est le site de clivage ciblé par le ribozyme (tel que défini par Ribosoft, le ribozyme coupe immédiatement après), vert et gris les séquences sur lesquelles les ribozymes s'hybrident par complémentarité.



Figure 3.6 : L'ADN de RFP avec les sites de clivage ciblé par les ribozymes

Les ribozymes (Rz) sont nommés selon le numéro du site GUC sur l'ARN. Quand l'ADN sera transcrit en ARN chaque ribozyme va couper dans un site GUC exactement entre le U et le C et cette coupure donnera une portion d'ARN de taille différente à chaque fois.

Tableau 11 : Séquences des amorces pour amplifier l'ADN du RFP

Nom	Type	Séquence
F RFP	Amorce sens	TAATACGACTCACTATAGCGTCTAGA
R RFP	Amorce anti-sens	TTATTAAGCACCGGTGGAG

- Amplification de l'ADN codant pour la portion de l'ARN 16S

L'amplification de l'ADN codant pour l'ARN 16S (Figure 3.7, 3.8) a été faite à partir du génome de la bactérie *Microcystis aeruginosa* NIES 298 à l'aide de deux amorces sens et anti-sens (F 16S et R 16S) (tableau 12) (Biocorp DNA Inc.) par une PCR de 35 cycles.

5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGGAAT
 CTTCGGATTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAAGAATCTAACTTCAGGACGGGGACAACAGTT
 GGAAACGACTGCTAATACCCGATATGCCGCGAGGTGAAACCTAATTGGCCTGAAGAAGAGCTTGCCTC
 TGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGC
 AGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATG
 GGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGGGAGGAAGGTC TTTGGATTGTAAACCTCTTTTCTCA
 AGGAAGAAGTTCTGACGGTACTTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
 CGGGGGAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTCAGCC AAGTCTGCT
 GTC AAATCAGGTTGCTTAACGACCTAAAGCGGTGGAAACTGGCAGACTAGAGAGCAGTAGGGGTAGC
 AGGAATTTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAACATCGGTGGCGAAAGCGTGCTAC
 TGGGCTGTATCTGACACTCAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCCCTGTAGTCCT
 AGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGCTTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGAAGCT3'

Figure 3.7 : Séquence de la portion du 16S

Portion de la séquence codante pour l'ARN 16S : numéro d'accèsion FJ461749, positions dans le 16S de 1 à 803. Code des couleurs : tel que décrit pour la cible RFP.

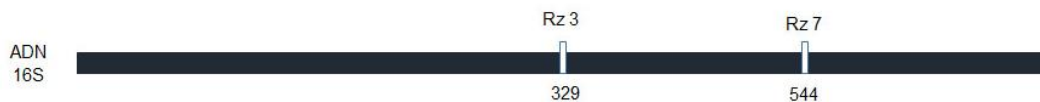


Figure 3.8 : La portion de l'ADN 16S avec les sites de clivage

Tableau 12 : Construction pour le test de spécificité.

nom	Type	Séquence
F 16S	Amorce sens	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
R 16S	Amorce anti-sens	AGCTTCGGCACGGCTCGG
T7	Amorce	TAATACGACTCACTATAGCG

- Electrophorèse sur gel d'agarose :**

Les tailles des produits de PCR ont été vérifiées par un gel d'agarose de 2% : 0.8 g d'agarose (Biobasic canada) était dissout dans 40 ml de Tris Acétate EDTA (TAE) 1X (40 mM Tris (pH 7.6), 20 mM acide acétique, 1 mM EDTA). Après la polymérisation du gel, 3 µL de chacun des produits de PCR est mélangé avec 1 µL de tampon de chargement qui est le bleu de migration natif 6X (40% sucrose, 0.05 % bleu de bromophénolet 0.05% bleu de xylène cyanol) pour alourdir la solution d'ADN afin qu'il entre dans les puits et pour suivre la migration à l'aide des deux bleus qui migrent à deux niveaux différents. La migration est faite dans le TAE 1X pendant 30 minutes à 120 V. Après, pour visualiser le résultat, le gel est mis dans le TAE 1X avec 5 µL du GelRed 1000X, pendant 30 à 45 minutes. Le GelRed qui s'intercale entre les bases de l'ADN, émet une fluorescence orange lorsqu'il est exposé la lumière Ultraviolet (UV).

Donc pour ceci nous avons utilisé l'appareil GelDoc (GelDoc XR⁺ with Image Lab T_M Software-BioRad) qui émet des rayons UV permettant l'excitation des molécules du GelRed.

- **Précipitation des produits de PCR :**

Pour précipiter l'ADN des ribozymes et des cibles, 0.1 volume d'une solution de sodium acétate 3 M et 2.5 volume d'éthanol 100% sont rajoutés à chaque produit de PCR et ils sont placés soit 30 min à - 80°C ou toute la nuit à -20°C. Ensuite une centrifugation à 14000 rpm (rotations par minute) pendant 20 min est appliquée pour faire précipiter l'ADN au fond du tube, le surnageant est jeté et le culot est lavé avec 400 µL d'éthanol 70%, suivi d'une centrifugation pendant 2 min à 14000 rpm. Finalement, le surnageant est jeté et l'ADN contenu dans le culot est laissé pour sécher pendant 1 heure. Avant son utilisation l'ADN est resuspendu dans 20 µL de H₂O.

3.1.2. Transcription des produits des PCR :

La transcription a été faite dans des réactions de 50 µl : le tampon de transcription TRX 1X (400 mM HEPES-KOH pH 7.5, 120 mM MgCl₂, 200 mM DTT, 10 mM spermidine), 2 mM des ribonucléotides (rNTPs) (A, U, C, G), 10 µL d'ADN (10-20 pmol) (produit de PCR), 1 U/µl pyrophosphatase inorganique (Sigma Aldrich, USA), 1U/µl d'ARN polymérase T7, 1U/µl d'inhibiteur des Rnases (NEB) et du H₂O milliQ stérilisé. La réaction est incubée 2 heures à 37 °C puis 1 µl de Dnase (NEB) est ajouté à chaque réaction et l'incubation est poursuivie à 37°C 30 min de plus. La transcription des cibles était faite selon le même protocole utilisé pour les ribozymes, mais elle a été gardée 3 heures à 37°C.

- **Extraction de l'ARN :**

Pour extraire les ARN, la double extraction au phénol/chloroforme était utilisée. Un volume de réaction de phénol chloroforme a été ajouté, puis, après une vigoureuse agitation, le tout a été centrifugé à 14000 rpm pendant 2 minutes pour séparer la phase aqueuse de la phase organique. La phase aqueuse a été récupérée, un volume de chloroforme a été ajouté (pour éliminer les restes du phénol) et une deuxième centrifugation à 14000 rpm pendant 2 minutes a été appliquée. La phase aqueuse a été récupérée et l'ARN précipité avec l'ajout de 0.1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5.2 et 2.5 volumes d'éthanol 100%, puis incubé à -20°C toute la nuit ou à -80°C pendant 30 min.

- **Electrophorèse sur gel de polyacrylamide :**

Pour vérifier la taille des ARN et/ou les purifier, une migration sur gel de polyacrylamide dénaturant a été faite. Après centrifugation et séchage, chacun des ARN a été resuspendu

dans 10 µl de H₂O et 10 µl de bleu formamide (0.3% bleu de bromophénol, 0.3% bleu de xylène cyanol, 12 mM EDTA dans du formamide). Les échantillons ont été chargés sur un gel de polyacrylamide dénaturant 6%: 12 ml d'acrylamide 20% (avec un ratio 19 :1 acrylamide:bisacrylamide, Tris Borate EDTA 1X [TBE] [89mM Tris pH 7,6, 89mM acide borique, 2mM EDTA] et urée 8M) et dilué dans 28 ml d'une solution de 8M urée, TBE 1X. Pour la polymérisation, 16 µL de TETra Méthyl Ethylène Diamine (TEMED) et 320 µL d'ammonium PerSulfate (APS) 10% ont été ajoutés. La migration a été faite dans du TBE 1X avec une puissance de 16 watt pendant 45 minutes à 1 heure. Après migration, la visualisation a été faite par ombrage aux UV et chaque bande correspondant à la bonne taille a été coupée et éluée dans 400 µl de tampon d'éluion (EDTA 0,1mM, NaCl 0,3M, SDS 0,001%) pendant 3 heures (pour les ribozymes) ou toute la nuit à 4°C (pour RFP).

- **Déphosphorylation de l'ARN des cibles :**

Afin de pouvoir marquer l'ARN RFP et la portion de l'ARN 16S par l'adénosine triphosphate (ATP) radioactif, il fallait le déphosphoryler par une réaction contenant 1 U/µl de l'*Antarctic phosphatase* (NEB) en présence de son tampon 1X (50 mM bis tris propane-HCl, pH 6, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂) un volume X de l'ARN, tout dépendamment de sa concentration, et le volume était complété jusqu'à 20 µL avec du H₂O milliQ. La réaction était incubée 30 min à 37°C, puis l'enzyme était inactivée à 65°C pendant 5 min.

- **Marquage radioactif de l'ARN des cibles :**

Pour être capable de détecter le résultat de la réaction de coupure de l'ARN cible par les ribozymes, il fallait marquer les ARN par de l'ATP³². L'ARN déphosphorylé a été mis en présence de 1U/µl de la T4 polynucléotide kinase (T4 PNK) (NEB), le tampon PNK 1X (70 mM tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 5mM DTT), X µL d'ATP³² (dépendamment de la concentration de l'ARN variant entre 0.1 et 5 picomoles) et le volume a été ajusté à 10 µl avec de l'eau milliQ stérilisée, le tout a été incubé pendant 1 heure à 37°C.

Après, la purification de l'ARN a été faite par migration sur un gel d'acrylamide 6% dénaturant tel que décrit. Cependant, après la migration une plaque phosphore (*storage phosphor screen*, Molecular Dynamics) a été exposée au gel pendant 5 min, puis scannée par le typhoon FLA 9500 (GE healthcare Life Sciences). La photo du gel a été imprimée à la même grandeur du gel ce qui a permis le positionnement de l'ARN sur l'image imprimée du gel et la coupure de la bande correspondant à la bonne taille de l'ARN du RFP. L'ARN a été élué toute la nuit à 4 °C puis précipité par l'éthanol 100 % et l'acétate de sodium toute la nuit à -20 °C.

3.1.3. Clivage de RFP par les ribozymes :

Dans le but de tester l'activité des ribozymes, ils ont été mis dans un tampon qui imite les conditions physiologiques (100 mM NaCl, 25 mM KCl, 50 mM tris HCl pH 7,5). Chaque ribozyme a été mis dans le tampon avec 1 µL de l'ARN de RFP radiomarqué et 4.25 µL de H₂O et incubé une minute à 85 °C pour permettre au ribozyme de se replier correctement. Ensuite, les tubes ont été mis immédiatement sur glace et avant de les incuber 30 min à 37 °C, 1 µL de MgCl₂ 1 M a été ajouté pour stabiliser la structure active du ribozyme. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 10 µL de bleu formamide.

3.1.4. Suivi de la cinétique des ribozymes :

Pour suivre l'activité de chaque ribozyme, la réaction a été préparée d'une façon à avoir des conditions semblables aux conditions physiologiques. L'ARN du ribozyme a donc été mis en présence de 25mM KCl, 100 mM NaCl, 50mM Tris, HCl pH 7.5 et 1 µL de l'ARN de RFP radiomarqué. La réaction a été mise à 85°C pendant 1 min pour aider les ARN à se replier correctement, puis 2 µL de MgCl₂ 100 mM a été ajouté pour déclencher la réaction et l'incubation est faite pendant 80 min à 37°C. Des aliquotes de 2 µL chacun ont été pris à 0s, 30s, 1', 2', 4', 8', 16', 32', 64' et 80' et chacun a été mis dans 10 µL de bleu formamide pour arrêter la réaction.

Tous les produits des réactions ont été migrés sur des gels de polyacrylamide 6% pendant 2 heures. Après, une plaque phosphore a été exposée au gel toute la nuit et scannées avec le typhoon.

3.1.5. Amplification de l'ADN des *riboswitchs* et du terminateur par PCR :

Dans le but de construire un circuit logique, les deux ribozymes 4(1), qui coupe dans le site GUC4 et qui a un rang 1, et 9(1), qui coupe dans le site GUC9, ont été choisis et à chacun d'eux un *riboswitch* a été rajouté afin de contrôler leur expression.

Tableau 13: Construction des ribozymes contrôlés par des riboswitchs

Nom	Type	Séquence
F lys	Amorce sens	TAATACGACTCACTATAGCGGGTGAAGATAGAGGTGCGAACTT
R lys	Amorce anti-sens	CCCGACGCTTAGTTCCAGAAAAGCAATGAGAGGAATCTCTCA
F SAM	Amorce sens	TAATACGACTCACTATAGCGATATCCGTTCTTATCAAGAGAAGCAG
R SAM	Amorce anti-sens	ACTACTTAGACGCTTCTGCCTCCTTTATTCACATC
F ter (4)	Amorce sens	TTTCGTCGCATTTCTCGAGCCAGGCATCAAATAAAACGA
R ter (4)	Amorce anti-sens	TATAAACGCAGAAAAGGCCACCCGAAG
F ter (9)	Amorce sens	GGTTTCGTCGCATTTCTCGAGCCAGGCATCAAATAAAACGA
R ter (9)	Amorce anti-sens	TATAAACGCAGAAAAGGCCACCCGAAG
F rz 4(1)	Amorce sens	CTGGAACTAAGCGGGCTGATG
R rz 4(1)	Amorce anti-sens	TTTGATGCCTGGCTCGAGCCATCTGTTCGTCGCATTTTC
F rz 9(1)	Amorce sens	TTTGATGCCTGGCTCGAGCCAGACGGTGGTTTCGTCGCATTTTC
R rz 9(1)	Amorce anti-sens	AGCGTCTAAGTAGTCTGATGAGTCGCT
Ter	ADN terminateur	GCTCGAGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCT CAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTTTGTCCGGTGAA CGCTCTCTACTAGAGTCACACTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTC TGCGTTTATA
SAM	ADN Rs SAM	ATATCCGTTCTTATCAAGAGAAGCAGAGGGACCCGACGAAGCTTCA GTAGATCAGAAAAATCAAGCTCGAACAGCTTGGAAAGATAAGAAGAG AAAAATCACTGACAAAGTCTTCTTTAAGAGGACTTTTTTATTTTC TCTTTTTTCTTTGCTGATGTGAATAAAGGAGGCAGA
Lys	ADN Rs Lys	GGTGAAGATAGAGGTGCGAACTTCAAGAGTATGCCTTTGGAGAAAG ATGGATTCTGTGAAAAGGCTGAAAGGGGAGCGTCGCCGAAGCAAA TAAAACCCATCGGTATTATTTGCTGGCCGTGCATTGAATAAATGT AGGCTGTCAAGAAATCATTTTCTTGGAGGGCTATCTCGTTGTTTCAT AATCATTTATGATGATTAATTGATAAGCAATGAGAGATTCTCTCA TTGCTTTTCTGGAACCTAAGCGGGCTG

Légende : Séquences des *riboswitchs* SAM et Lysine, des ribozymes 4 et 9 et des amorces pour les amplifier, avec Rs : *riboswitch*, rz : ribozyme, Lys ; lysine, ter : terminateur.

- **Amplification des ADN des riboswitchs et du terminateur :**

Le *riboswitch* lysine et le *riboswitch* SAM-I ont été choisis car ils agissent les deux par inhibition au niveau de la transcription en présence de leurs ligands spécifiques. Les ADN des deux *riboswitchs* ont été amplifiés à partir du génome de *Bacillus subtilis* à l'aide d'amorces (Integrated DNA Technologies, IDT). L'amorce anti-sens (R lys) pour le *riboswitch* Lysine contenait une partie du ribozyme 4(1) et celle du *riboswitch* SAM-I (R SAM) contenait une partie du ribozyme 9(1) (tableau 13).

En plus il fallait rajouter une séquence d'un terminateur de transcription à la fin pour permettre la libération d'un ARN ne contenant que la séquence d'intérêt. L'ADN du terminateur 'T1/TE' a été amplifié à partir du plasmide 'pRI02' construit au laboratoire (Imane, 2016) à l'aide des deux amorces (D ter et R ter) (tableau 13) avec l'amorce directe contenant une partie de la séquence du ribozyme ce qui a donné une séquence chevauchant celle du ribozyme permettant d'utiliser cet ADN pour la PCR d'assemblage du ribozyme et terminateur.

- **PCR d'assemblage :**

La PCR d'assemblage servait à assembler les séquences du *riboswitch*, ribozyme et terminateur de transcription en un seul brin d'ADN en utilisant à chaque fois deux amorces sens et anti-sens comme illustré à la Figure 3.9.

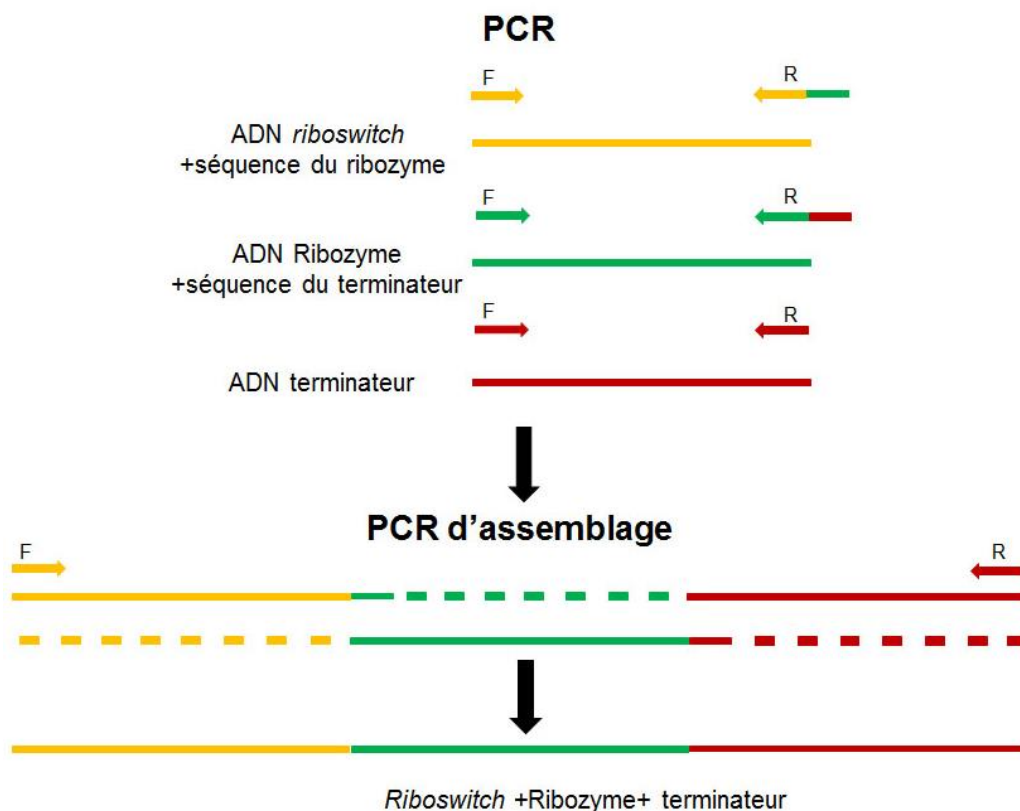


Figure 3.9: PCR d'assemblage.

Chacun des trois ADN est amplifié seul, puis les trois sont assemblés en un seul ADN par une PCR d'assemblage. F : amorce sens, R : amorce anti-sens.

Les réactions de PCR d'assemblage ont été faites dans un volume final de 100 µL contenant : le tampon Thermopol 1X de la compagnie NEB, 2mM des dNTP, l'amorce sens à 2 µM (D lys ou D SAM), l'amorce antisens à 2 µM (R ter) (tableau 12), les trois ADN matrices (*riboswitch*, ribozyme et terminateur), 1U/µl de la taq ADN polymérase (NEB) et le volume a été complété

avec de l'eau milliQ stérile. Les amorces utilisées pour l'amplification ont été commandées chez IDT.

3.1.6. Test de l'ensemble ribozyme + *riboswitch* + terminateur :

Après l'amplification et la vérification des tailles des séquences assemblées par un gel d'agarose 2%, les ADN ont été précipités à l'éthanol tel que décrit précédemment. Ensuite les ARN ont été générés par transcription *in vitro*, ils ont été migrés sur un gel de polyacrylamide 6%, puis élués du gel toute la nuit et finalement précipités à l'éthanol.

Afin de tester les ensembles 'RS+Rz+Ter' chacun a été mis en présence de l'ARN de RFP radiomarké dans le même tampon que celui utilisé pour tester les ribozymes pendant 30 minutes (section 3.1.3). Finalement, les produits des réactions ont été chargés sur un grand gel de polyacrylamide 6% et migrés pendant 2 heures à 50 watt. Le gel a été exposé à une plaque phosphore toute la nuit et le lendemain la visualisation a été faite par le Typhoon FLA 9500.

3.1.7. Valider l'opération XOR :

L'opération XOR est l'une des opérations logiques les plus compliquées à appliquer en passant par plusieurs étapes pour obtenir le résultat final attendu. Dans ce projet, nous avons choisi de la simplifier à une seule étape en utilisant deux ribozymes conçus par 'Ribosoft' contre l'ARNm de RFP et auxquels des séquences complémentaires ont été ajoutées aux deux extrémités 3' et 5' de chaque ribozyme (Figure 3.10). Les séquences complémentaires sont rajoutées pour permettre l'hybridation des deux ribozymes ce qui va inhiber leurs activités en empêchant la liaison de chacun de ces ribozymes à l'ARN du RFP.

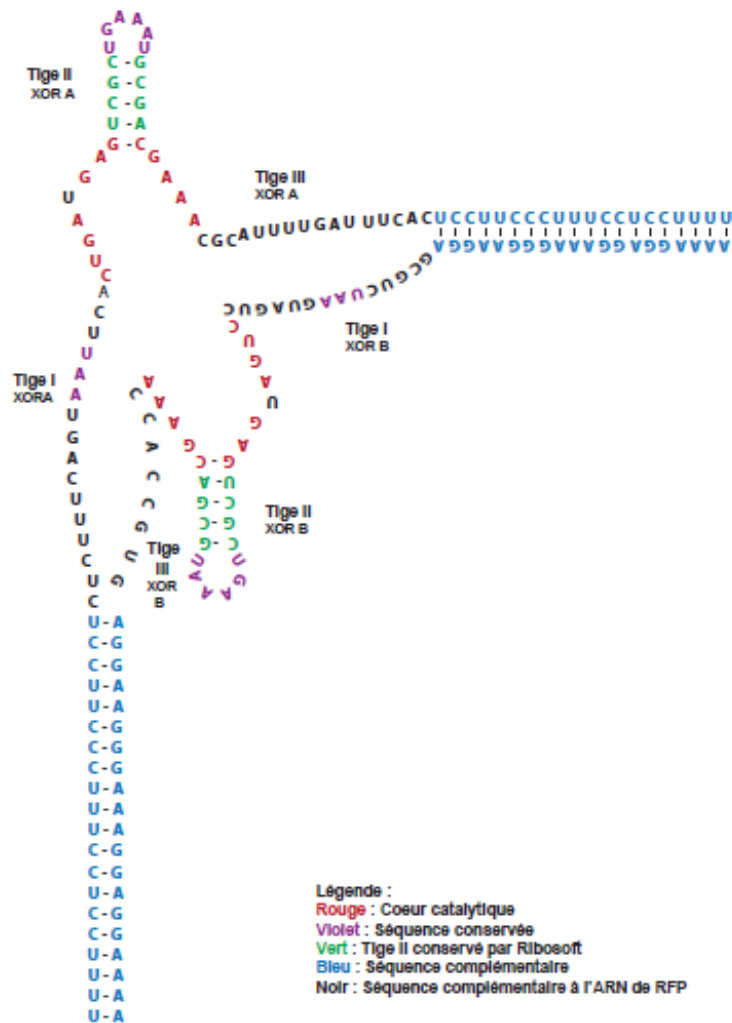


Figure 3.10: Hybridation des ribozymes XOR

En fait, le choix des ribozymes pour cette opération était basé sur la complémentarité entre les séquences des deux ribozymes où plus de complémentarité augmente les chances d'une inhibition mutuelle efficace de l'activité des ribozymes. Les séquences ci-dessous montrent des exemples : où la séquence du haut est celle ribozyme XOR A et du bas est celle du ribozyme XOR B

```

UUUCCCUUCCUCGCGUCUAAGUAGUCUGAUGAGUCGCUGAAAUGCGACGAAACCAACCGUCCUCCCUUU
AAAGGGAAGGAUCUUUCAGUAAUUUCACUGAUGAGUCGCUGAAAUGCGACGAAACGCAUUUUGAUUUCACAGGAA
GGGAAA
  
```

Figure 3.11 : complémentarité entre le ribozyme XOR A et le ribozyme XOR B

Légende : Le même code de couleurs est utilisé sauf pour les couleurs rose et rouge qui indiquent la complémentarité entre les bases où les bases en rouge forment des paires de base avec ceux qui sont en rose.

- **Amplification de l'ADN des ribozymes XOR :**

Les ADN ont été amplifiés par PCR en utilisant comme matrices les oligonucléotides XOR A, XOR B et les amorces du tableau 13 (BioCorp DNA Inc) et en suivant le même protocole que dans les autres parties. La taille des produits de PCR a été validée par un gel d'agarose 2% avant de les précipiter à l'éthanol.

Tableau 14 : Construction des ribozymes pour l'opération XOR.

Nom	Type	Séquence
XOR A	Ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGTTTTTCCTCCTTCCCTTC CTCTCCTTTCAGTAATTTCACTGATGAGTCGCTGAAATG CGACGAAACGCATTTTGATTTCACTCCTTCCCTTTCCT CCTTTT
D XOR A	Amorce sens	TTTTTCCTCCTTCCCTTCCTC
R XOR A	Amorce anti-sens	TAATACGACTCACTATAGCGCAAAA
XOR B	Ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGAAAAGGAGGAAAGGGAAG GAGCGTCTAAGTAGTCTGATGAGTCGCTGAAATGCGAC GAAACCACCGTAGGAAGGGAAGGAGGAAAA
D XOR A	Amorce sens	AAAAGGAGGAAAGGGAAGGAG
R XOR B	Amorce anti-sens	TAATACGACTCACTATAGCGCTTTTC

Légende : Séquences des ribozymes XOR et des amorces pour les amplifier. Avec le même code de couleurs utilisé pour les autres ribozymes.

- **Transcription des ribozymes XOR :**

Les ADN des ribozymes XOR nommé ribozyme A (coupe dans le site GUC8) et ribozyme B (coupe dans le site GUC9) ont été transcrits *in vitro* dans des réactions de 50 µl et les ARN purifiés comme décrit précédemment.

- **Clivage de RFP par les ribozymes XOR :**

L'ARN de RFP a été mis en présence des ribozymes XORA ou XORB ou les deux ensembles. Toutes les réactions ont été faites dans un volume de 10 µl contenant 25mM KCl, 100 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7.5, 5 pmol de l'ARN du ribozyme et 1 µl de l'ARN de RFP radiomarqué dans de l'eau milliQ stérile. La réaction a été incubée à 85°C pendant 1 min pour aider les ARN à se replier correctement, puis 1 µl de MgCl₂ 100 mM est ajouté pour déclencher la réaction et l'incubation est faite pendant 1 heure à 37°C. Les réactions de coupure ont été migrées sur gel de polyacrylamide 6% et le gel a été exposé à une plaque phosphore toute la nuit pour finalement visualiser le résultat à l'aide du Typhoon FLA 9500.

3.1.8. Les tests *in vivo* :

- **Préparation des cellules compétentes :**

Les cellules utilisées pour faire les transformations étaient des *E. coli* BL21 DE3 possédant l'ARN polymérase T7, capable de reconnaître le promoteur T7. Une pré-culture a été lancée toute la nuit, le lendemain 1 ml de culture a été dilué dans 100 ml de LB (Luria Broth, Alpha biosciences) pour lancer une nouvelle culture. La DO à 600 nm a été prise chaque 30 min jusqu'à ce qu'elle atteigne 0.5. Les bactéries ont été mises sur glace pendant 15 min pour arrêter la croissance. Ensuite, les bactéries ont été transférées dans des tubes de 50 ml et centrifugées pendant 15 minutes à 5000 rpm à 4°C. Après, le surnageant a été jeté et au culot, 33 ml de tampon 1 glacé (1M KCl, 1M CaCl₂, 15% glycérol, le pH est ajusté à 5.8 avec l'acide acétique glaciale) a été ajouté. Le tout a été agité doucement et le tube a été gardé sur glace pendant 1 heure avant d'être centrifugé pendant 15 minutes à 5000 rpm à 4°C. Finalement, le surnageant a été jeté, le culot resuspendu dans 4 ml de tampon 2 (1M KCl, 1M CaCl₂, 0.5 M MOPS, 15% glycérol, pH 6.8) et gardé 15 min sur glace pour être ensuite aliquoté en 200 µl dans des tubes eppendorfs de 2 ml et congelé rapidement à -70°C.

- **Amplification des ensembles 'ribozyme+terminateur' par PCR d'assemblage :**

Pour valider l'activité des ribozymes *in vivo*, le même terminateur de transcription a été ajouté à la séquence de cinq différents ribozymes par PCR d'assemblage comme mentionné dans la partie 3.1.6. À chacune d'eux la séquence du site de restriction (Sacl ou SmaI) a été ajoutée pour permettre le clonage (tableau 15).

Tableau 15 : Construction pour les essais *in vivo*.

Nom	Type	Séquence
Rz 9 (m)	Ribozyme	AGACGGTGGGGCCGTCGCATTTTCAGCTCCTCATCAGAC TACTTAGACGCTCGCTATAGTGAGTCGTATTA
D Rz 9	Amorce sens	ACCCCCGGGTTCCTAATACGACTCACTATAAGCGTCTA AGTAGTCTGATGAGGA
Rz Yz 144	Ribozyme	GGCCTGGAGTTTCGTTCGCATTTTCAGCGACTCATCAGTG AGGTTAAACTGGAGCCTGCGCTATAGTGAGTCGTATTA
D Yz 144	Amorce sens	ACCCCCGGGTTCCTAATACGACTCACTATACAGGCTCC AGTTTAACTCACTGATGAGTCGCTG
Rz 7 (1)	Ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGTTCTGCATTAATAACCGCT GATGAGTCGCTGAAATGCGACGAAACCGTCGGACG
D rz 7 (1)	Amorce sens	ACCCGAGCTCTTCTAATACGACTCACTATAGCGTTCTG CATTAAAACCGCTGATGA
Rz 9 (1)	Ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGAGCGTCTAAGTAGTCTGA TGAGTCGCTGAAATGCGACGAAACCACCGTCT
Rz 4 (1)	Ribozyme	TAATACGACTCACTATAGCGCTGGAAGTAAGCGGGCTG ATGAGTCGCTGAAATGCGACGAAACAGGATG
D rz 4 (1)	Amorce sens	ACCCCCGGGTTCCTAATACGACTCACTATACTGGAAGT AAGCGGGCTGATGA
R rz 4 (1)	Amorce anti-sens	TGATGCCTGGCTCGAGCCATCCTGTTTTCGTCGCATTTTC AGCGACTCATCAGCCCGCTTA
Ter	Termineur	GCTCGAGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCT CAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTTTTG TCGGTGAACGCTCTCTACTAGAGTCACACTGGCTCACC TTCGGGTGGGCCTTTCTGCGTTTATA
D ter 9	Amorce sens	GCGACGGCCCCACCGTCTGCTCGAGCCAGGCAAATAAA ACG
D ter 144	Amorce sens	GCGACGAAACTCCAGGCCGCTCGAGCCAGGCATCAAAT AAAACG
D ter 7	Amorce sens	ACCCGAGCTCTTCTAATACGACTCACTATAGCGTTCTG CATTAAAACCGCTGATGA
R ter+SacI	Amorce anti-sens	CGTAGAGCTCTATAAACGCAGAAAGGCCACCCGAAGG TGAGCCAGTGTGA
R ter+smaI	Amorce anti-sens	TATAAACGCAGAAAGGCCACCCGAACCCGGGCGTA

Légende : Séquences des ribozymes et du terminateur utilisés pour les tests *in vivo* et des amorces pour les amplifier.

Les amorces utilisées pour ces PCR étaient commandées de chez IDT.

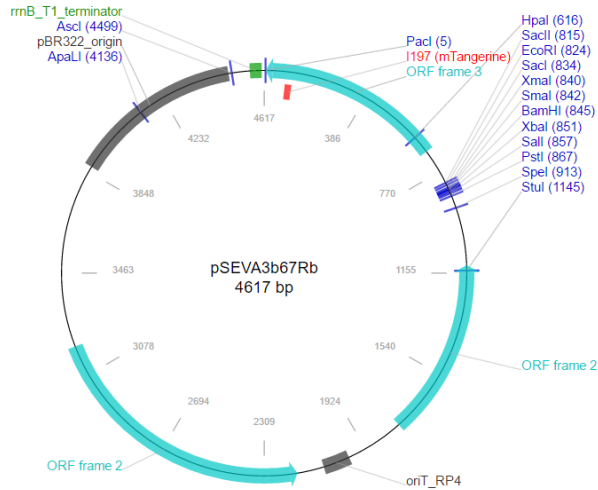


Figure 3.12: Le plasmide pSEVA3b67Rb. (Addgene)

- **Digestion de l'ADN 'ribozyme+terminateur' et du plasmide 'pSEVA3b67Rb'**

Dans le but de cloner les ribozymes dans le plasmide contenant la séquence codante pour RFP, le plasmide (Figure 3.12) a été extrait par le kit 'EZ-10 Spin Column, plasmid DNA Kit' (BioBasic) à partir d'une culture fraîche de *E. coli* DH10B. Après, les produits de PCR 'ribozymes+terminateur' et le plasmide extrait ont été digérés par l'enzyme de restriction correspondante à chaque fois : les ribozymes 4(1), 9(1) muté et yz144 ainsi que le plasmide sont digérés par SmaI et les ribozymes 7(1) et 9(1), de même que le plasmide, sont digérés par SacI.

La réaction de digestion prenait 2 heures à 37°C dans un volume final de 20 µl qui contenait : le tampon de l'enzyme de digestion (cutsmart buffer) 1X (50 mM acétate de potassium, 20 mM Tris-acétate, pH 7.9, 10 mM acétate de magnésium, 100 µg/ml BSA (*bovine serum albumin*) de tampon de l'enzyme de restriction, 1µg de plasmide ou l'ADN de l'insert, 1U/µl de l'enzyme et le volume était ajusté avec de l'eau milliQ stérile.

- **Déphosphorylation du plasmide :**

Pour empêcher la fermeture du plasmide après sa digestion il fallait le déphosphoryler par l'Antarctic phosphatase (NEB)

- **Ligation du plasmide et de l'insert :**

La complémentarité entre les extrémités de plasmide et de l'insert digéré par la même enzyme de restriction permettait le clonage de ce dernier dans le plasmide par une réaction de ligation à l'aide de l'enzyme T4 ADN ligase et de son tampon de réaction 1X (50 mM Tris-HCl, 10 mM

MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7.5 à 25°C) pendant 2 heures à la température de la pièce avec un ratio de 10 : 1 (insert pour plasmide).

- **Transformation des bactéries :**

Cinq ribozymes ont été clonés et, comme contrôle, un plasmide sans insert a été utilisé. Donc 50 µl de *E. coli* BL21 DE3 (car la transcription des ribozymes était contrôlée par un promoteur T7 et cette souche produit la polymérase T7 lors qu'induite avec l'IPTG (L'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) ont été mis en présence des réactions de ligation pendant 30 min sur glace. Après, ces plasmides ont été incubés 45 secondes à 42°C pour effectuer le choc thermique, puis mis sur glace 2 minutes avant d'être incubés entre 1h à 1h30 à 37°C dans du Super Optimal Broth (SOC) (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ et 20 mM glucose) sous agitation. Entre temps, des boîtes de pétri de LB agar ont été préparées (10 g tryptone (Fisher scientific), 5 g d'extrait de levure, 10 g NaCl (J.T Baker), 15 g agar (Alpha Biosciences) dans 1L d'eau milliQ) avec l'antibiotique correspondant (chloramphénicol 6 µg/ml) et de l'IPTG (1 mM). Les bactéries ont été étalées sur les géloses et incubées toute la nuit à 37°C. Dans le but de vérifier les clones préparés, le lendemain 10 colonies de chaque cultures ont été piquées et ensemencées dans du LB en présence d'IPTG et de chloramphénicol et ils étaient incubés toute la nuit à 37°C sous agitation.

- **Mesure de la fluorescence :**

Après avoir incubé la culture bactérienne toute la nuit dans du milieu LB, une aliquote de 200 µl de chaque culture a été prise et mise dans un puit d'une plaque de 96 puits transparents et la fluorescence a été mesurée au Typhoon FLA 500 à la longueur d'onde d'émission de RFP (dsRed) (635 nm). Ensuite, l'intensité de la fluorescence a été normalisée par la DO mesurée à l'aide du nanodrop 2000C (Thermoscientific).

- **Vérification de la présence de l'expression des ribozymes :**

La vérification de la présence de la séquence du ribozyme dans le plasmide était faite de deux façons : 1-une PCR sur colonie ou sur bouillon de culture ou 2-par une PCR sur les plasmides qui ont été extraits à partir des cultures bactériennes fraîches, en utilisant les amorces utilisées pour les PCR d'assemblage et des amorces qui s'hybrident sur le plasmide hors de la séquence du ribozyme et du terminateur (F plas et R plas) (tableau 15). Les PCR ont été faites en respectant le protocole décrit pour les autres PCR avec une seule différence, au lieu de mettre l'ADN plasmidique, 1 µL de culture bactérienne a été ajouté à chaque réaction. Finalement, pour les PCR montrant des résultats positifs (donnant la taille attendue), les plasmides correspondant ont été envoyés à séquencer.

Tableau 16 : Séquences des amorces du plasmide pSEVA3b67Rb

Nom	Type	Séquence
F plas	Amorce sens	TTCTAATACGACTCACTATAGCCGCGGCCGCGGAAT
R plas	Amorce anti-sens	CGGCCGCGGCCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCG

3.2. Partie enzymer :

3.2.1. Amplification des ribozymes

- **Ribozyme en tête de marteau :**

Les oligonucléotides utilisés pour amplifier les ribozymes (tableau 17) ont été commandés de chez BioCorp DNA Inc. et à chacune des séquences de ribozyme, la séquence du promoteur T7 a été ajoutée pour pouvoir faire la transcription *in vitro* après. Les ribozymes ont donc été amplifiés par une PCR de 15 cycles et la température d'hybridation utilisé était de 49°C.. Quinze ribozymes ont été testés, dont 13 conçus par Enzymer. Un contrôle positif, la séquence sauvage (*wild type*) qui a été utilisée comme point de départ par Enzymer pour générer les ribozymes (Figure 3.13), et un contrôle négatif qui un des ribozymes générés par Enzymer, mais avec trois mutations dans le cœur catalytique. La vérification de la taille des produits de PCR a été faite par un gel d'agarose 2% contenant le 'GelRed' pour la visualisation à l'UV.

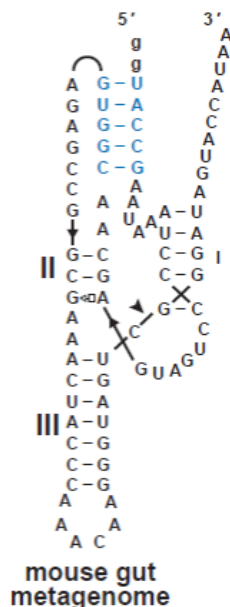


Figure3.13: Structure secondaire d'un ribozyme en tête de marteau de type I (dans le métagénome de la souris).

La séquence en bleu correspond au pseudonœud, 'I, II et III' correspondent aux tiges I, II et III. Tiré de (Perreault *et al.*, 2011)

Tableau 17 : Séquences des ribozymes en tête de marteau générés par Enzymer.

Nom	Type	Séquence
T7	Amorce	TAATACGACTCACTATAGG
Wt	ribozyme	TTATGGTACTATCCCGACTACCCTTGTTTTGGGTAGTTTTCGCCGGCTCTCA CCGTTGCTCATCAGGGGATTTATTCGGTACCCCTATAGTGAGTCGTATTA
Hhd 4	ribozyme	AGTATATATTGGGTTCGAGTTATAATGGAATATAACTTTTCGCTACGGTGT AACTGGCTCATCAGGACCCTTTTCGCTACGACCTATAGTGAGTCGTATTA
Hhd 5	ribozyme	GTATAGAAAACCGCCGACCGTAGGTAGTTCTACAGTTTTCGCTTTTATTCA GAGTTGCTCATCAGGGCGGAAGGGCTCCGTTCTATAGTGAGTCGTATTA
Hhd 10	ribozyme	TTTTTTTTTTGGGTTCGACCCATCTTAATCGACGGGTTTTCGCTTTTTTTGT CGCTTGCTCATCAGGACCCTTTTTCGACGGCTATAGTGAGTCGTATTA
Hhd 14	ribozyme	TTTTTTTCTCGGGCCGACTTCGCTCTTTCACGAAGTTTTCGCTTTTTTTGT CCCTCGCTCATCAGGGCCCTTTTTGGGACTTCTATAGTGAGTCGTATTA
Hhd 19	ribozyme	AATAGGTAGAGGTCCGACCGAGAAAAGATCTCGTTTTTCGCTCGTTTTTCG GCCTAGCTCATCAGGGACCGGGGGGCGTCCCTATAGTGAGTCGTATTA
Hhd 22	ribozyme	CACTTCTCCTGGGGCGACCTGGCAGCTGAACCAGTTTTCGTTTTTTTCGC GGGTCATCATCAGGCCCTCTCTCCGCTTCTATAGTGAGTCGTATTA
Hhd 27	ribozyme	CTTTTTTTTTGTGCCGAGGACCCGTTTCATGGGCCCTTTTCGCTTTTTTTCC ACCTCGCTCATCAGGGCACTTTTTGGTGGTTCCTATAGTGAGTCGTATTA
Hhd 31	ribozyme	CGTTTTATTTGCGGCGAGGCACTCTATCTAGTGCCTTTTCGTTTTTTTCCG GACTCACTCATCAGGCCGCTTCTTGTCGCTCCTATAGTGAGTCGTATTA
Hhd 36	ribozyme	CGTTTTTTTTGGGCCGAGGTCCGCTCGTTCGGACCTTTTCGCTTTTTTTCC AGGTCGCTCATCAGGGCCCTTTTTCCCTGGTTCCTATAGTGAGTCGTATTA
Hhd 41	ribozyme	TCTTTCCTCCAGGCCGACGGACATATCAATCCCGTTTTTCGCTTTTTTTGA GACTCGCTCATCAGGGCCTTTTTTGCTCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA
Hhd 49	ribozyme	GGTTTTTTGTGGGCCGACTCCACTCTGTCATGGAGTTTTCGGTTTTTTGG TCCGTGCTCATCAGGGCCCTTTTTGGACCTTCTATAGTGAGTCGTATTA
Hhd 51	ribozyme	TTCTTTTTTTGGTTCGACAGCACTTCTCGTGCTGTTTTCGCTTTTTTTGA GGGTCGCTCATCAGGAACCTTTTTCCCTCTTCTATAGTGAGTCGTATTA
Hhd 53	ribozyme	GGTGTGTTTTGGGTTCGACCGCCTTATCTGACCGTTTTTCGCTTTTTTTTA GCCGTGCTCATCAGGACCCTTTTTGGCCATTCTATAGTGAGTCGTATTA
Hhd 9 m	ribozyme	GTGTTTTTTTTGCGGCGAGCAAGCGTATATGCTTGC GG TCGGTTTTTTTTCT AGCTTCCTCATC CC TCCGCTTTTTTGCTAGTTCCTATAGTGAGTCGTATTA

Légende : Les nucléotides colorés rouge sont les nucléotides mutés.

- **Amplification des ribozymes GImS :**

Les matrices d'ADN pour le ribozyme GImS sauvage et le ribozyme généré par Enzymer, ainsi que les amorces (tableau 18) ont été commandées chez Biocorp DNA Inc. La PCR de 25 cycles a été faite à une température d'hybridation de 65°C et les mêmes conditions que pour celles des ribozymes en tête de marteau, pour générer un produit de PCR de 155 paires de bases.

Tableau 18 : Ribozymes GImS

Nom	Type	Séquence
GImS WT	ribozyme	AGCGCCTGGACTTAAAGCCATTGCACTCCGGCTTTAAGTTGACGAG GGCAGGGTTTATCGAGACATCGGCGGGTGCCCTGCGGTCTTCCTGC GACCGTTAGAGGACTGTGAAAACCACAGGCGACTGTGGCATAGAGC AGTCCGGGCAGGAA
D GImS WT	amorce	TTCTAATACGACTCACTATAAGCGCCTGGACTTAAAGCCATTGCAC TCCGGCTTTAAGTT
R GImS WT	amorce	TTCCTGCCCGGACTGCTCTATGCCACAGTCGCCTGTGGTTTTTCACA GTCCTCTAACG
GImS 1	ribozyme	TGTGCGGTGGCAACCGTGTATTAGGCGTTTTTCACGCCTATTTGAGG TCGCCTTTTGGGGCCCGCACTGCCCCCAGCTTCCGCCGATTTTTT CGATTTGCTGGGCCCTCGTCCATGTCAGCTTTTTTTTTTCTGAC ATAGAGCTGGCGCTcgctatagtgagtcgatta
D GImS 1	amorce	TTCTAATACGACTCACTATAAGCGCCAGCTCTATGTCAGAAAAAAA AAGCTGACATGG
R GImS 1	amorce	TGTGCGGTGGCAACCGTGTATTAGGCGTTTTTCACGCCTATTTGAGG TCGCCTTTTGG

3.2.2. Transcription *in vitro* :

La synthèse *in vitro* des ribozymes en tête de marteau a été faite en présence d'UTP³² radioactif pour pouvoir visualiser le résultat de la réaction d'auto-clivage durant la transcription. La réaction de 50 µl contenait l'ADN produit par PCR, 10 mM rNTPS (rATP, rGTP, rCTP), 4 mM UTP, tampon TRX 1X, 1U/µl de pyrophosphatase inorganique, 1U/µl d'inhibiteur RNase, 1U/µl d'ARN polymérase T7 et elle a été incubée 2 heures à 37°C. Après, 1 µl de DNase a été ajoutée pour dégrader la matrice d'ADN. Enfin, un aliquote de chaque ribozyme a été pris et ajouté à un volume égal de tampon bleu formamide 2X.

Les ribozymes pleins longueur et leur version coupée ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 10%. Ensuite, les bandes correspondant à la pleine longueur de chaque ribozyme ont été coupées et ils étaient extraits.

Ensuite l'activité des ribozymes a été testée à cinq températures différentes par une incubation de 15 min à : 17°C, 27°C, 37°C, 47°C et 57°C dans le tampon des ribozymes (Tris HCl 50 mM pH 7.4, KCl 25 mM, NaCl 1 mM and MgCl₂ 2 mM) et finalement le résultat était visualisé sur un gel de polyacrylamide 10%.

-Pour les ribozymes GImS, comme le ribozyme ne coupe qu'en présence de son cofacteur, la transcription a été faite normalement sans UTP radioactif, et après la transcription, l'ARN était extrait par phénol/chloroforme, précipité à l'éthanol 100% et purifié sur un gel de polyacrylamide 6%. Afin de visualiser les résultats de clivage, l'ARN des ribozymes était déphosphorylé et marqué en 5' avec de l'ATP³² radioactif. En plus, pour les étapes de

déphosphorylation et marquage à l'ATP radioactif, le tampon utilisé à chaque fois contenait l'HEPES à la place du tris-HCl car ce dernier a un groupement amine qui peut réagir avec le ribozyme et causer la réaction d'auto-clivage en absence du glucosamine-6-phosphate (Glc6P).

Après le marquage, les ARN ont été purifiés sur un gel de polyacrylamide 6% et élués toute la nuit à 4°C dans le tampon d'éluion. Le lendemain ils ont été précipités et séchés. Ensuite, chacun des ribozymes (wt et 1) a été mis dans un tampon identique à celui utilisé pour les ribozymes précédemment, et en présence ou en absence de 20 µM de GlcN6P dans une réaction de volume final de 10 µl et ils ont été incubés pendant une heure à 23°C. Les réactions ont été arrêtées par 10 µl de bleu-formamide et chargées sur un gel de polyacrylamide 6%, puis migrées pendant 45 min. Finalement, le gel a été exposé à une plaque phosphore toute la nuit et scanné le lendemain avec le Typhoon.

3.2.3. Test de l'activité des ribozymes *in vivo* :

En utilisant Enzymer, nous avons également conçu un ribozyme avec une séquence flanquant le début de la séquence codant pour la RFP. En tant que modèle, un ribozyme de type I de chez *Yarrowia lipolytica* a été utilisé (Figure 3.16). La séquence conservait les éléments importants pour l'activité du ribozyme, ce qui signifie : le cœur catalytique et le pseudo-nœud, de même que la séquence importante pour RFP, ce qui signifie : le 'Shine Dalgarno' (site de liaison du ribosome) et la partie de la séquence codante qui chevauche la séquence du ribozyme. Le but était d'avoir une protéine non défectueuse et d'être sûr que, si on observe une baisse dans l'expression de la protéine, elle est causée par l'activité du ribozyme, et non par une mutation dans la séquence de la protéine.

Enzymer a généré 10 séquences parmi lesquelles deux ont été choisies (hhd00 et hhd05). Pour avoir un contrôle négatif, nous avons muté les deux ribozymes dans le cœur catalytique sans affecter la séquence codante.

- **Input de Enzymer :**

A-Ribozyme hammerhead de type I trouvé chez *Yarrowia lipolytica* :

```
GGGGGACUGGCUGCC CUGAUG-AGA ACAAACCC AUGACUAG CGUCG AA ACAUCAACAGU GGGG
GCUGUUGGUGU-C-G*GCAGCCA CUAGUCAU AA
```


Le deuxième ribozyme testé est le ribozyme HH05 :

Tableau 19 : Construction des ribozymes HH05.

Nom	Type	Séquence
HH05	Ribozyme	ACCCGAGCTCTTTTACACTTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTATATACCC GTCTTCCCTGATGATCCAAAAAATTTGATGAAGGAGAAACGAGGCAT GGCTTCGTCGGAAGACGTTATCAAAGACGTTATCAAAGAGTTCATGCG TTTCAAAGTTCGTATGGAAGGTTCCGTTAACATGC
Hh05 muté	Ribozyme	ACCCGAGCTCTTTTACACTTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTATATACCC GTCTTCCCTTGCAAATCCAAAAAATCTGATGAAGGAGAAACGAGGCAT GGCTTCGTCGGAAGACGTTATCAAAGACGTTATCAAAGAGTTCATGCG TTTCAAAGTTCGTATGGAAGGTTCCGTTAACATGC
D hh05	amorce	ACCCGAGCTCTTTTACACTTTTATGCTTCCGGCTCGTATG
R hh05	amorce	GCATGTTAACGGAACCTTCCATACGAACTTTGAAACGC
Hh05+ mutation	amorce	TTTTTTTGGATTGCAAGGGAAGACGGGTATATAACATACGAGCCGGAA

Légende : Séquences des ribozymes HH05 et HH05 muté et les amorces pour leurs amplifications. Avec le même code des couleurs utilisé précédemment.

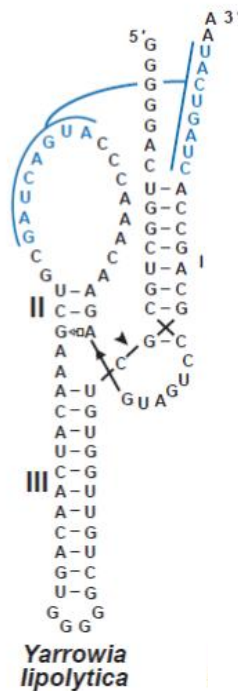


Figure 3.16: Structure secondaire du ribozyme en tête de marteau de type I (dans le génome de *Yarrowia lipolytica*).

La séquence en bleu correspond au pseudonœud, 'I, II et III' aux tiges I, II et III (Perreault *et al.*, 2011).

La séquence du ribozyme Hh00 a été ajoutée au reste de la séquence codante de RFP, avec la séquence du promoteur lac en amont et le tout a été commandé déjà cloné dans un plasmide pUC57 chez 'Biomatik' (Figure 3.17), de même qu'un contrôle négatif où le même ribozyme a quatre mutations dans le cœur catalytique afin d'inactiver l'autoclivage. Le ribozyme hh05, ainsi que les amorces sens et anti-sens et l'oligonucléotide contenant la partie mutée du ribozyme (tableau 18) ont été commandés chez IDT.

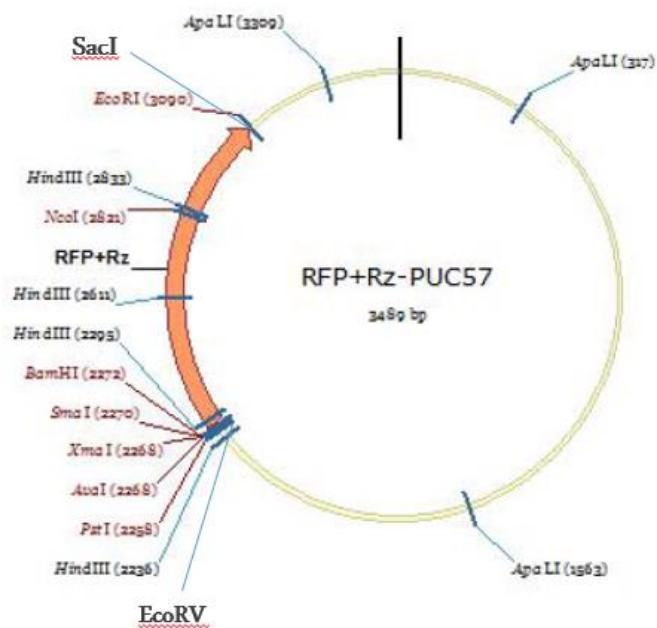


Figure 3.17: Plasmide pUC57 avec la séquence de RFP et le ribozyme

La séquence de l'ensemble 'promoteur Lac+ribozyme en tête de marteau+séquence codante de RFP' est insérée entre les sites EcoRV et SacI.

Les plasmides (pUC57) (Figure 3.17) contenant les deux ribozymes, Hh00 actif et muté, ont été digérés chacun par les deux enzymes 'Sacl' et SphI' pendant 1 heure à 37°C en présence du tampon cutsmart 1X. La digestion a été purifiée sur un gel d'agarose 1% pour extraire l'insert à re-cloner, la bande correspondant à l'insert ribozyme-RFP a été coupée et l'ADN extrait par le kit EZ 10 spin column plasmid DNA kit (Biobasic).

La ligation du plasmide digéré avec l'insert (avec un ratio 1:10) a été faite à la température de la pièce pendant 2 heures en présence de la T4 ligase et son tampon 1X (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7.5). Ensuite, les plasmides ont été transformés dans des cellules compétentes *E. coli* BL21 DE3 selon le même protocole utilisé dans la partie 3.1.9.

Le lendemain trois colonies de chaque culture ont été piquées etensemencées dans du LB en présence d'ampicilline et ont été incubées toute la nuit à 37°C sous agitation.

Le lendemain, la DO de chaque culture a été mesurée par le nanodrop, un triplicata pour chaque culture a été utilisé pour lancer des cultures avec trois concentrations différentes

d'IPTG (1mM, 2mM, 4mM) (ceci était un test préliminaire où les concentrations d'IPTG étaient finalement toutes en excès, donc les cultures ont été considéré comme des triplicatas). De chaque culture 1 ml a été dilué dans 9 ml de LB pour avoir au final 36 cultures (trois cultures chacune à une concentration d'IPTG à partir de chacune de 12 cultures lancées à partir des colonies piqués au début). Les cultures ont été incubées à 37°C et la DO et l'intensité de la fluorescence ont été mesurées (à l'aide de Typhoon FLA) une fois chaque heure pendant 5 heures et après la culture toute la nuit.

4 RESULTATS :

4.1. Validation de Ribosoft :

4.1.1. Activité des ribozymes synthétiques :

La première étape clé de ce projet était de prouver que les ribozymes conçus par Ribosoft sont actifs. Ainsi, nous avons commencé par le test de trois ribozymes, à savoir A2(1), A7(1) et A9(4), qui ciblent trois sites différents sur l'ARN de RFP.

Les ribozymes n'avaient pas les mêmes niveaux d'activité ce qui nous a amené à penser à tester d'autres ribozymes pour savoir si les différences observées sont en corrélation avec les paramètres donnés par Ribosoft ou non.

Dix nouveaux ribozymes qui coupent dans six sites GUC différents ont été testés : un dans le site GUC2, un dans le site GUC5 et deux ribozymes pour chacun des sites GUC4, GUC7, GUC9 et GUC11. Ces ribozymes avaient des rangs différents, du rang 1 au dernier rang donné par Ribosoft (les ribozymes supposés être les moins actifs). Ce rang est donné dépendamment des valeurs de paramètres calculés par Ribosoft comme l'accessibilité, la qualité de la structure secondaire. Un autre ribozyme conçu manuellement avec des bases ajoutées aux extrémités 3' et 5' qui ne sont pas complémentaires à la séquence de la cible. La nomenclature des ribozymes correspond à la fois au site de clivage et au rang, par exemple un ribozyme 2(4) coupe dans le site GUC2 et auquel Ribosoft a donné le rang 4.

En plus, trois ribozymes ont été essayés sur une portion de l'ARN 16S de *Microcystis aeruginosa* NIES 298, dont deux conçus par Ribosoft : un qui cible le site GUC3 et l'autre le site GUC7, et le troisième ribozyme qui cible aussi le GUC7 mais conçu manuellement en rajoutant des nucléotides en 3' et 5' qui ne s'hybrident pas à la cible.

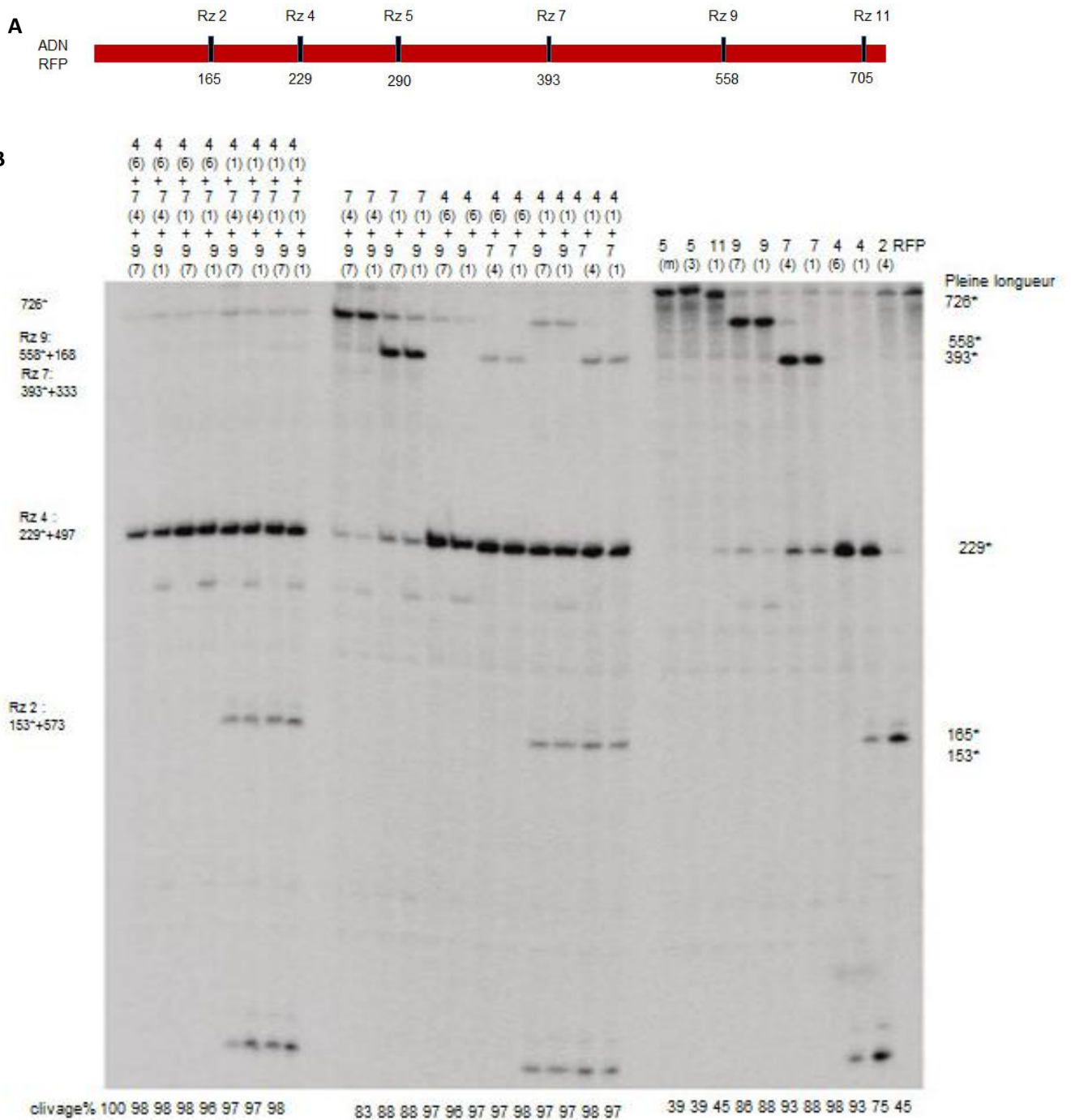


Figure 4.1: Test des ribozymes conçus par Ribosoft sur l'ARNm de RFP.

Figure A représente l'ADN de RFP avec les sites de clivages des ribozymes ainsi que les tailles attendues après les coupures par les ribozymes. Figure B : Les chiffres en haut correspondent aux noms des ribozymes, les bandes les plus hautes correspondent à l'ARN de RFP pleine longueur et les plus basses à la partie 5' de l'ARN du RFP coupé par les ribozymes. A gauche du gel les chiffres indiquent la taille attendue de la partie coupée et radiomarquée de RFP. Le pourcentage de clivage a été calculé en divisant l'intensité de la radioactivité de toutes les positions correspondant aux bandes de coupure par la somme de ces bandes et de l'ARN pleine longueur, comme l'ARN de RFP sans ribozyme est « clivé » à 45%, cela peut être considéré comme le bruit de fond. Adapté de (Kharma *et al.*, 2016)

En fait la totalité de 17 ribozymes a été testé *in vitro* sur les deux cibles : l'ARNm de RFP et la portion de l'ARN 16S de la bactérie *Microcystis aeruginosa*. La Figure 4.1 montre que les ribozymes conçus contre RFP sont tous actifs avec un taux de clivage variant entre 75% et 98% sauf le ribozyme 11(1) qui coupe très proche de l'extrémité 3' de l'ARN de RFP. Pour ce dernier, il n'est donc pas clair si la bande correspond à la coupure ou à l'ARN complet. Aussi, il n'y a pas une grande différence entre l'activité de deux ribozymes qui coupaient au même site, mais auxquels Ribosoft a donné des rangs différents comme le 9(1) qui a une activité de 88% et le 9(7) avec 86% d'efficacité.

Le ribozyme 5(3) généré par Ribosoft, a quant à lui une accessibilité égale à 0 et le 5(m) est conçu à la main avec une complémentarité imparfaite et il est utilisé comme contrôle négatif, les deux indiquent un taux de clivage de 39% ce qui montre qu'ils ne sont pas actifs car RFP seul montre un taux de dégradation de 45% dû au bruit de fond.

La combinaison de deux ou trois ribozymes augmente le taux de clivage encore plus en atteignant la barre de 100% pour la combinaison 4(6), 7(4) et 9(7). Pour la plupart des combinaisons, la bande correspondant à la pleine longueur de l'ARN de RFP disparaît complètement.

La Figure 4.2 montre le résultat pour les ribozymes testés sur la portion de l'ARN 16S, le ribozyme 3(1) avait une efficacité de clivage de 87% et les ribozymes 7(4) et 7(m) ont les mêmes caractéristiques que les ribozymes 5(3) et 5(m).

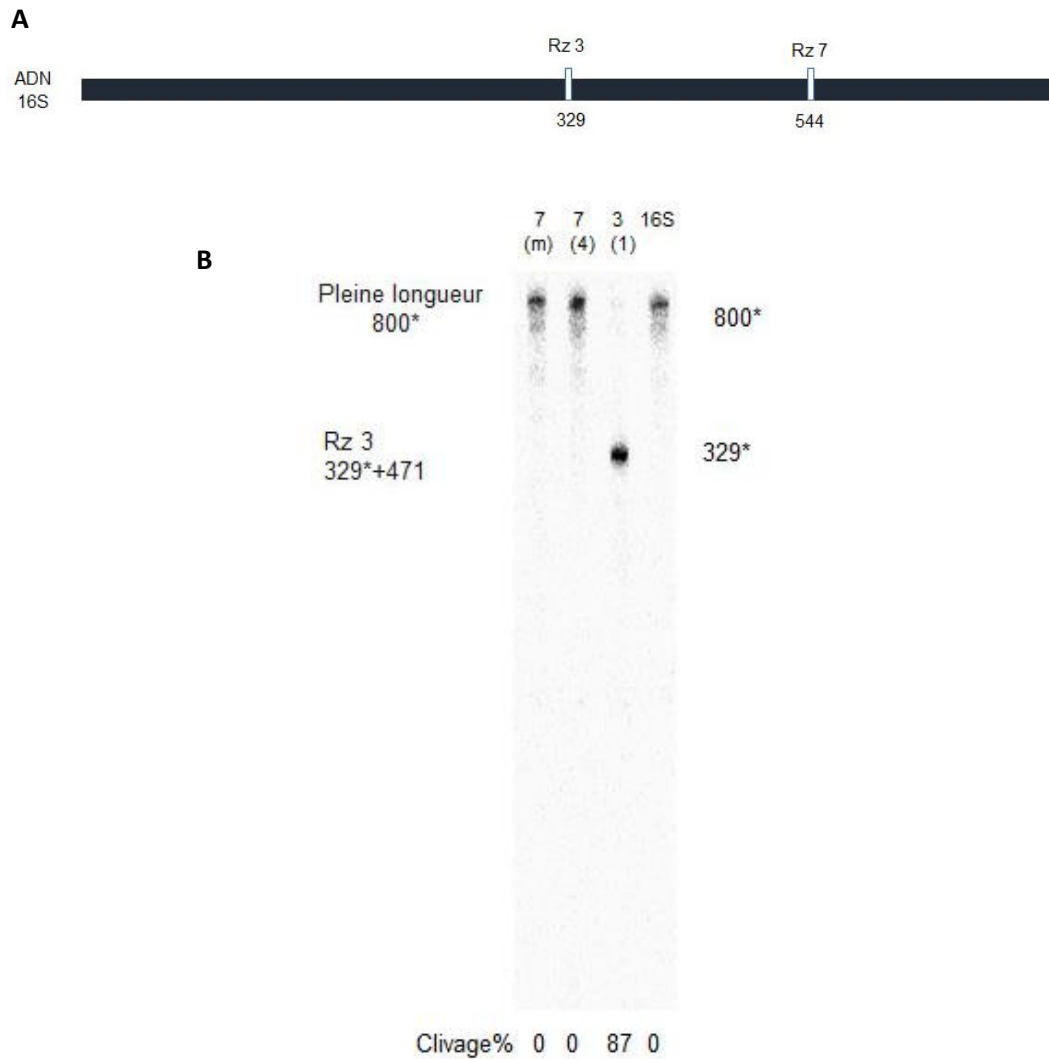


Figure4.2: Test des ribozymes conçus pour la portion de l'ARN 16S.

Figure A représente l'ADN de la portion d'ARN 16S avec les sites de clivages des ribozymes ainsi que les tailles attendues après les coupures par les ribozymes. Figure B : Les chiffres au-dessus du gel montrent les noms des ribozymes, les bandes en haut correspondent à l'ARN 16S pleine longueur et la bande plus basse à la partie 5' radiomarquée de l'ARN. Adapté de (Kharma *et al.*, 2016)

4.1.2. Cinétique des ribozymes :

L'activité de chaque ribozyme a été suivie pendant 80 minutes en prenant des aliquotes à des temps différents et ceci pour deux buts : le premier était pour calculer la constante de vitesse en déterminant combien de temps la réaction clivage de chaque ribozyme prend pour atteindre un état statique. Le deuxième but était de comparer les ribozymes qui coupent au même site, mais qui ont des classements différents selon 'Ribosoft'.

Nous avons suivi la cinétique de sept ribozymes au total. A titre d'exemple, dans le cas des ribozymes 9(1) et 9(7) (Figure 4.3A), l'activité du 9(1) est supérieure à celle du 9(7) pendant les 20 premières minutes et elle augmente rapidement jusqu'à atteindre un maximum à 20

minutes alors que le rendement du ribozyme 9(7) est plus lent et n'atteint un maximum qu'après 40 minutes (Figure 4.3B).

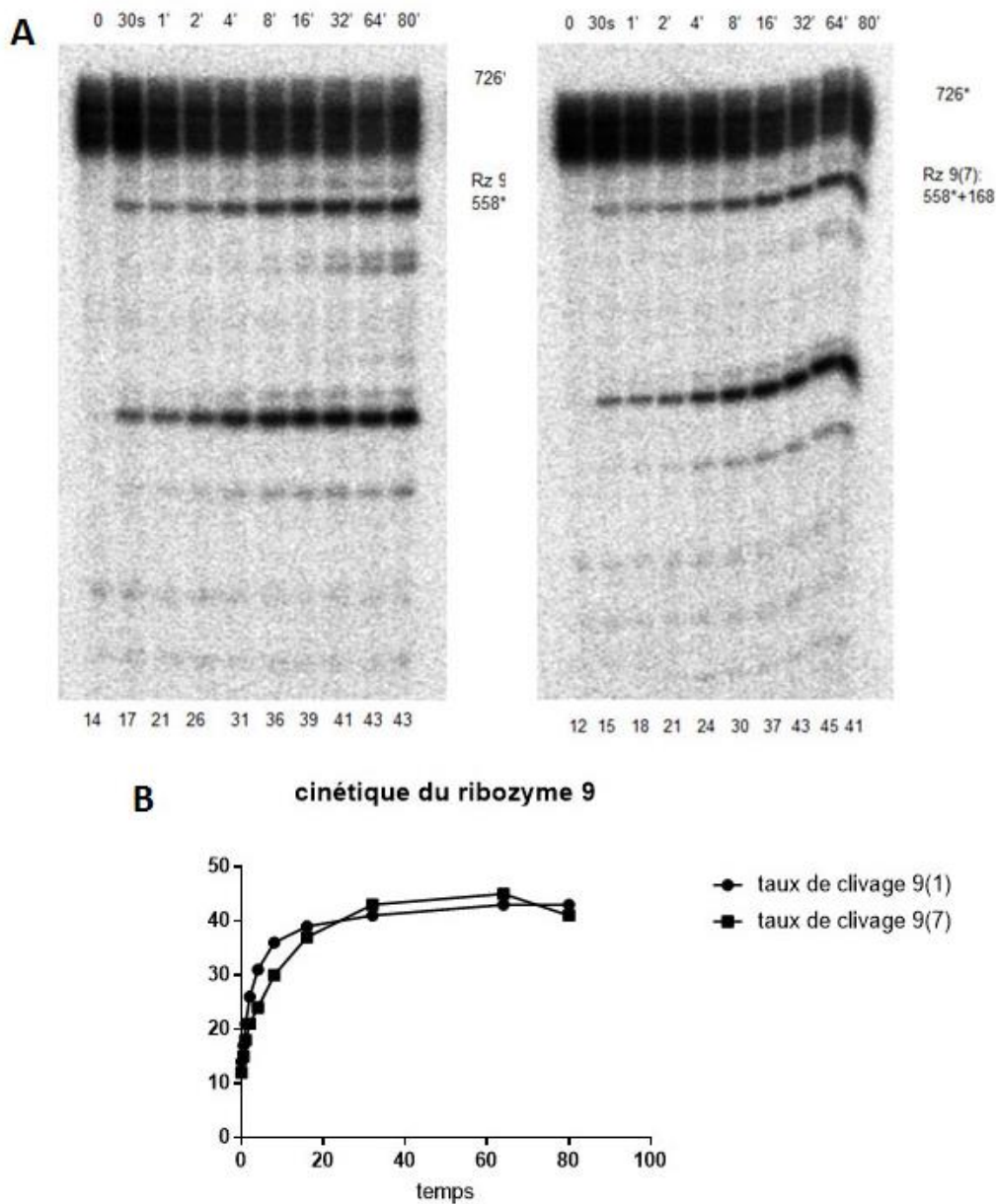


Figure4.3 : Suivi de la cinétique des ribozymes 9(1) et 9(7).

A : L'activité des ribozymes étaient suivie pendant 80 min et les temps auxquels les aliquotes ont été prises sont montrés au-dessus du gel. L'ARN était probablement contaminé par des RNase ce qui explique l'existence de plusieurs bandes au lieu de deux seulement, mais la bande correspondant à l'ARN du RFP coupé par le ribozyme est celle qui a la taille 558*. On peut noter que plusieurs versions du substrat d'ARN coexistent dans la série de bandes en haut du gel, expliquant que l'on obtienne plusieurs produits de coupure. B : Courbes de cinétique du ribozyme 9 montrent l'avancement de l'activité de coupure des ribozymes 9(1) et 9(7) pendant 80 minutes.

Finalement, nous avons essayé de démontrer s'il y avait une corrélation entre les valeurs des paramètres donnés par 'Ribosoft' et les résultats expérimentaux des 'tests students' que nous avons utilisés pour voir s'il y a une différence significative entre le groupe contenant les ribozymes classés '1' et un groupe contenant le reste, mais le résultat était toujours non significatif même en essayant plusieurs combinaisons ce qui peut être dû au nombre faible de ribozymes testés ne permettant pas de discerner de trop faibles pouvoirs discriminant des paramètres comparés (tableau 20).

4.1.3. Spécificité des ribozymes conçus par Ribosoft :

La spécificité des ribozymes conçus par Ribosoft a été validée en testant les ribozymes conçus pour dégrader le RFP contre la portion de l'ARN 16S. La Figure 4.4 montre que tous les ribozymes étaient incapables de dégrader l'ARN 16S. Les bandes visibles correspondent à la dégradation de l'ARN, qui peut être causée par une contamination à des RNases, car le profil de dégradation est identique en absence et en présence des ribozymes (Figure 4.4).

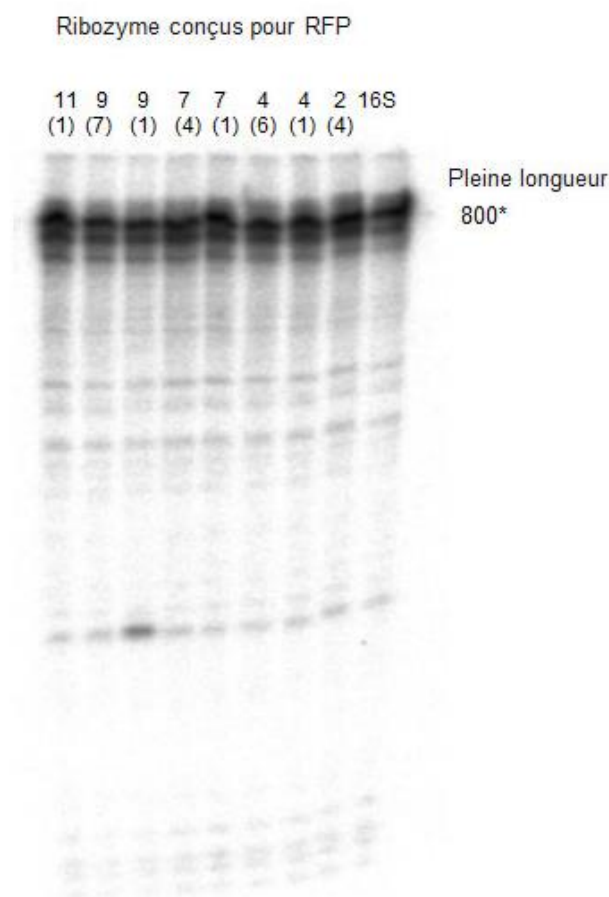


Figure4.4: Test de la spécificité des ribozymes.

Les bandes les plus foncées en haut correspondent à l'ARN 16S complet de taille 800 nucléotides. Les ribozymes utilisés pour tester leur spécificité sont les ribozymes conçus pour l'ARN de RFP.

4.2. L'utilisation des ribozymes dans des opérations logiques :

4.2.1. L'opération logique XOR :

Après avoir testé l'activité et la spécificité des ribozymes générés par Ribosoft, quelques ribozymes étaient choisis pour construire le circuit logique.

Pour appliquer le principe de l'opération XOR, ou 'OU exclusive', nous avons pris deux ribozymes capables de cliver l'ARN de RFP dans les sites GUC9 et GUC8. Nous avons ajouté des séquences complémentaires aux extrémités 5' et 3' et leur avons donné les noms respectifs ribozyme XOR A et ribozyme XOR B.

Le principe de l'opération XOR est qu'en présence de seulement l'un ou l'autre des deux ribozymes XOR A ou B il sera actif et dégradera l'ARN de RFP, mais en présence des deux les ribozymes s'hybrideront par complémentarité des séquences qui sont aux extrémités (Figure 3.10), ce qui inhibera leurs activités et l'ARN de RFP ne se dégradera pas.

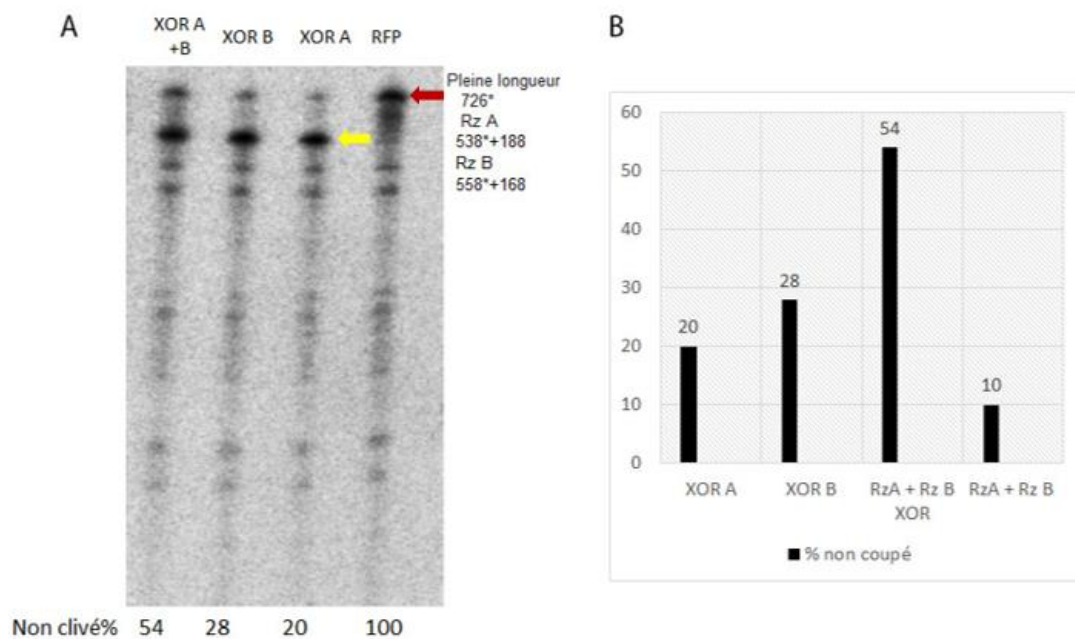


Figure4.5: Validation de l'opération XOR.

A : le gel montrant le RFP radiomarqué en présence et en absence des ribozymes XOR A et B où la bande la plus haute (flèche rouge) correspond toujours à l'ARN complet non dégradé, et la bande directement en dessous de la première (flèche jaune) correspond à la partie 5' de l'ARN coupé par le ribozyme. **B** : Histogramme représentant la quantité de RFP non clivé par les ribozymes XOR A et B et une estimation de la quantité non clivée si les ribozymes n'avaient pas de séquence complémentaire (RzA+RzB)

Nous avons testé chacun des ribozymes seuls ou ensemble et nous avons calculé le pourcentage de l'ARN de RFP radiomarqué qui n'était pas dégradé (Figure 4.5A). Nous avons trouvé qu'en présence du ribozyme XORA ou XORB seul il n'y a que 20% et 28% de l'ARN de RFP qui n'était pas clivé, respectivement. Par contre, lorsque les deux ribozymes étaient mis ensemble, le taux de RFP non clivé était de 54%, alors qu'en extrapolant à partir d'autres combinaisons de ribozymes effectuées (comme présenté dans la Figure 4.1 les combinaisons des deux ribozymes donnent des taux de clivage entre 83% et 97%), on s'attendrait à au moins 90% de coupure si nous avons utilisé des ribozymes ne s'hybridant pas entre eux. (Figure 4.5B).

4.2.2. Effet de l'ajout de la séquence du riboswitch devant le ribozyme *in vitro* :

Pour construire le circuit logique il y'avait besoin de rajouter un élément avec lequel les ribozymes peuvent être contrôlés et l'élément choisi pour ce projet était le *riboswitch* d'où nous avons mis deux *riboswitchs* différents devant deux ribozymes générés par Ribosoft pour obtenir deux constructions différentes.

Les deux constructions : '*riboswitch* de lysine, ribozyme 4(1) et terminateur de transcription' (Lys-Rz4 ci-après) et '*riboswitch* SAMI, ribozyme 9(1) et terminateur de transcription' (SAMI-Rz9 ci-après) ont été testés chacun sur l'ARN de RFP radiomarqué. Dans le cas du ribozyme 9(1), le ribozyme seul coupe le RFP presque complètement, mais pour le SAMI-Rz9, il n'y a pas de coupure. Quant au ribozyme 4(1), son rendement a baissé de 89% à 41% pour Lys-Rz4 (Figure 4.6).

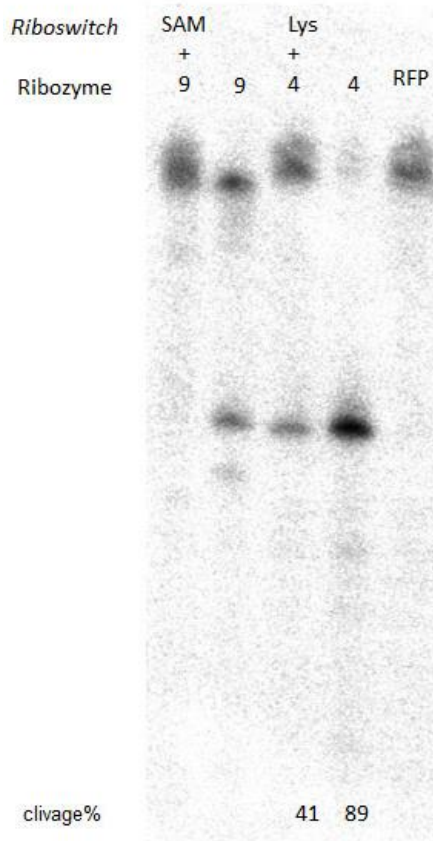


Figure 4.6: L'effet de l'ajout des riboswitchs aux ribozymes.

L'activité des ribozymes 4 et 9 est comparée à l'aide du taux de clivage en présence du ribozyme seul ou combiné au riboswitch Lys ou SAMI.

4.3. Activité des ribozymes *in vivo* :

Un test préliminaire de l'activité des ribozymes *in vivo*, a montré qu'en présence des constructions prévues pour les ribozymes 4(1) et 7(1) (avant de vérifier si les ribozymes étaient clonés dans les plasmides par PCR et séquençage) la fluorescence diminue plus en comparaison qu'en présence du ribozyme 9(1) muté qui peut se lier à l'ARN de RFP sans le dégrader (Figure 4.7). Cependant, après la PCR en utilisant des amorces qui s'hybridaient à l'insert (ribozymes et terminateur) et des amorces qui s'hybridaient au plasmide de part et d'autre de l'insert, le seul ribozyme qui était détecté est le 7(1). Ceci reste néanmoins encourageant car cela montre que la présence du ribozyme cause plus de dégradation et donc de diminution de la fluorescence par rapport à la diminution de la fluorescence causée par la manipulation du plasmide et de la bactérie. Le séquençage du plasmide n'a pu valider que le ribozyme 7(1).

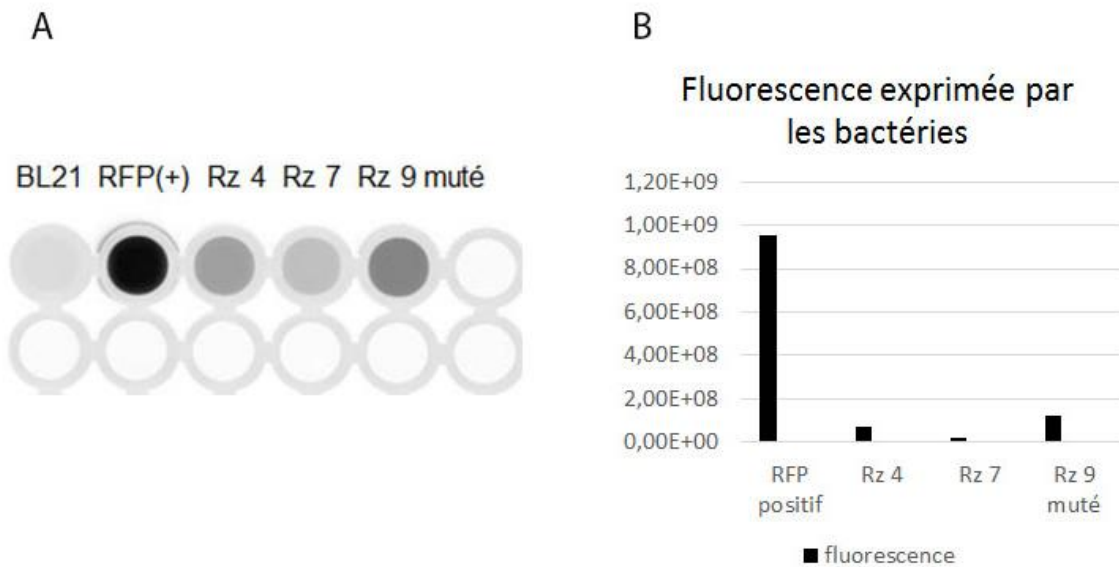


Figure 4.7 : Mesure de la fluorescence émise par les bactéries *E. coli* BL21 DE3.

Pour ce test, seulement le clone pour le ribozyme 7 était positif et les deux autres étaient négatifs. A : la fluorescence émise par les bactéries mesurée par le typhoon. B : Histogramme montrant la fluorescence émise par les bactéries normalisée par la DO.

4.4. Partie Enzymer

4.4.1. Test *in vitro* des ribozymes en tête de marteau :

Comme mentionné dans l'introduction, le but ultime de l'utilisation de 'Enzymer' est de concevoir des séquences pour des structures d'ARN qui ont des pseudo-nœuds, tout en permettant d'intégrer des contraintes pour rendre l'ARN compatible avec d'autres applications. Certains ribozymes en tête de marteau de type I ont un pseudo-nœud qui se forme entre la tige I et la tige II. Ainsi, des ribozymes ont été conçus par Enzymer en utilisant comme modèle la structure secondaire d'un ribozyme Hammerhead de type I trouvé dans le métagénome de la souris (Perreault et al 2011). Enzymer a généré 60 séquences de ribozymes, parmi elles, nous avons choisi treize ribozymes pour comparer leur activité avec le type sauvage. Aussi, pour être sûr que le résultat que nous voyons est dû à l'activité d'auto-clivage, et pas simplement l'hybridation du ribozyme à l'ARNm, nous avons muté le cœur catalytique d'un ribozyme pour l'inactiver. Si le ribozyme est actif, il est censé donner deux fragments, un de 17 nucléotides (parce que la réaction de clivage se fait dans le C17) et l'autre de 64.

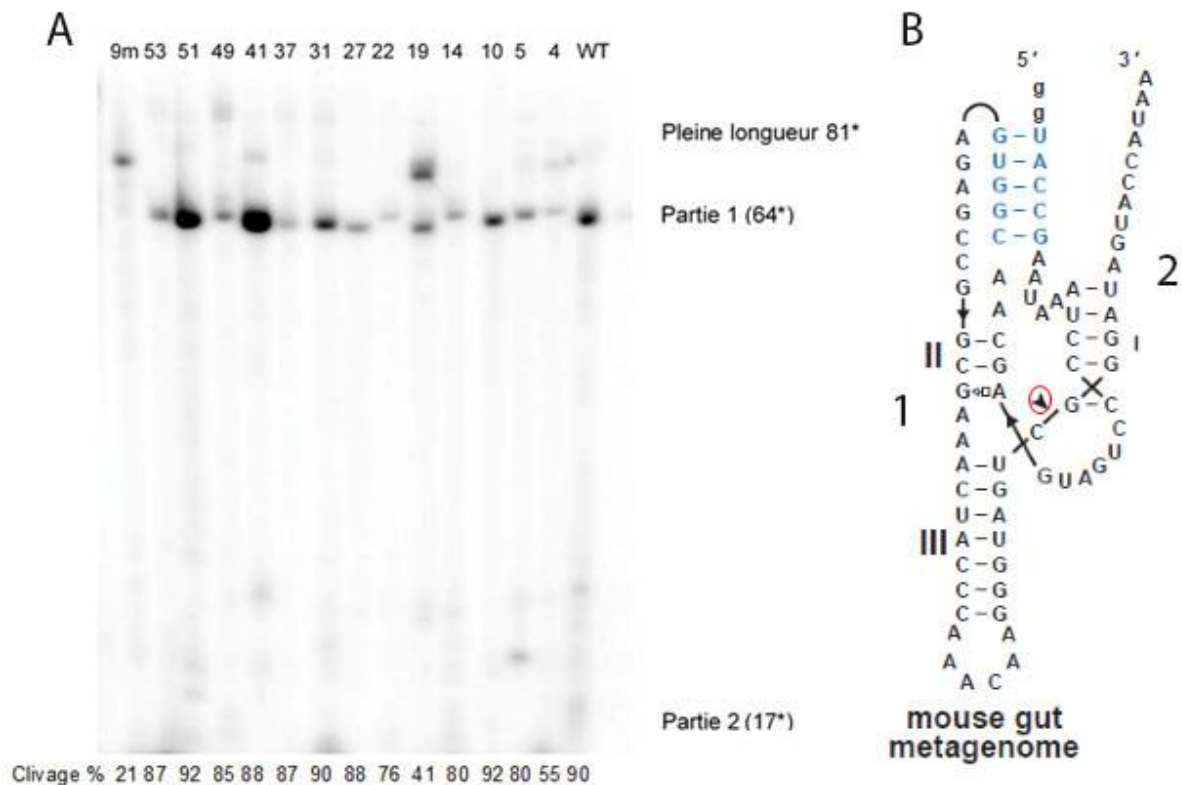


Figure 4.8: Test de l'activité des ribozymes en tête de marteau conçus par Enzymer.

L'auto-clivage du ribozyme génère deux portions d'ARN indiqué par partie (1) et partie (2) sur le gel (A) et qui correspondent aux chiffres (1) et (2) dans (B) ou la coupure se fait au site désigné par la petite flèche entourée du cercle rouge. Adapté de (Perreault *et al.*, 2011)

La petite différence de taille entre les bandes correspondant à la partie 1 des ribozymes clivés peut être due à la qualité du gel (des bulles d'air par exemple) qui peut affecter la migration des ARN. En plus, la présence d'un ou deux nucléotides en plus ou en moins dans une séquence générée par Enzymer crée une différence et même des séquences ayant le même nombre de nucléotides leurs transcrits peuvent avoir une différence de taille d'un ou deux nucléotides dépendamment du succès de la transcription qui peut inclure ou non ces nucléotides.

La Figure 4.8 montre le ribozyme utilisé comme matrice par Enzymer (WT), avec un taux d'autoclivage de 90%, et ceux générés par enzymer, qui montrent des taux généralement élevés variant entre 76% et 92%, sauf pour le ribozyme 4 (55%) et le 19 (41%). Le ribozyme muté dans le cœur catalytique ne donne que 21% comme pourcentage de clivage. Ainsi, la majorité des séquences de ribozymes conçues par Enzymer ont une activité comparable au WT. En d'autres mots, Enzymer est un logiciel qui génère des séquences dont la capacité à se replier correctement a un excellent taux de réussite et ce, même si la structure visée a des pseudonoeuds.

4.4.2. Test *in vitro* des ribozymes GlmS :

Le ribozyme GlmS est naturellement induit par le GlcN6P pour effectuer sa réaction de clivage. Le ribozyme GlmS WT et un ribozyme GlmS1 généré par Enzymer ont été testés en absence et en présence du GlcN6P, mais n'ont pas montré de résultats clairs. La Figure 4.9 montre pour chaque test deux bandes. Normalement, la bande la plus haute devrait correspondre à la pleine longueur et l'autre à la séquence sans la partie clivée, c'est-à-dire avec quatre nucléotides de moins. Cependant, dans le cas du GlmS wt, en absence du GlcN6P la bande correspondant normalement au ribozyme clivé est moins intense que dans le cas où le Gl6P est présent. Pour le ribozyme GlmS1, le profil des deux tests (en absence et en présence du Gl6P) semble être le même avec une absence de la deuxième bande en bas.



Figure4.9: Test de l'activité des ribozymes GlmS.

Le ribozyme GlmS WT et celui généré par enzymar ont été testés pour leur activité de clivage en absence et en présence du GlcN6P (20 μ M) pendant une heure à 21°C et migrés sur un gel 6%. Un ribozyme en tête de marteau inactif de 98 nucléotides est utilisé comme marqueur de taille. Les ribozymes GlmS non-coupés doivent avoir 155 nucléotides et les coupés 151 nucléotides.

4.4.3. Séquence avec deux niveaux d'information : codante et catalytique :

L'efficacité de la conception faite par enzymar a été validée par l'essai de l'activité des ribozymes en tête de marteau *in vitro*. La prochaine étape était de vérifier si un des principaux but de ce programme, qui est de concevoir des structures d'ARN actives tout en ayant des contraintes de séquence. Nous avons donc choisi de faire une séquence où un ribozyme en tête de marteau chevauche en grande partie la séquence codante de RFP et inclut aussi le site de liaison du ribosome (Figure 4.10).

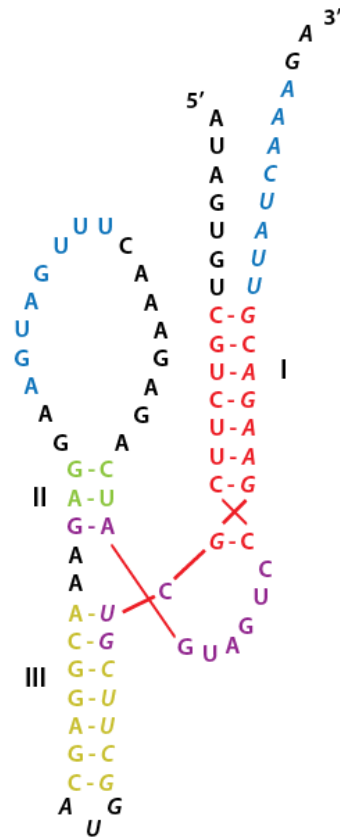


Figure 4.10 : Structure secondaire du ribozyme incluant la séquence codante.

Code des couleurs : noir : non inclus dans des paires de bases – rouge : tige I - violet : cœur catalytique - vert : Tige II – bleu : Pseudonoed - jaune : tige III - en italique : la séquence codante.

Les séquences conçus ont été testée *in vivo* en les insérant chacune dans un plasmide qui a été transformé dans des bactéries BL21DE3. Après avoir cultivé des bactéries durant une nuit, la fluorescence mesurée, puis normalisée par la DO, (Figures 4.11) ne donne pas une idée claire, il y a des ribozymes qui semblent être capables de dégrader le RFP et d'autres non mais ces résultats sont à confirmer.

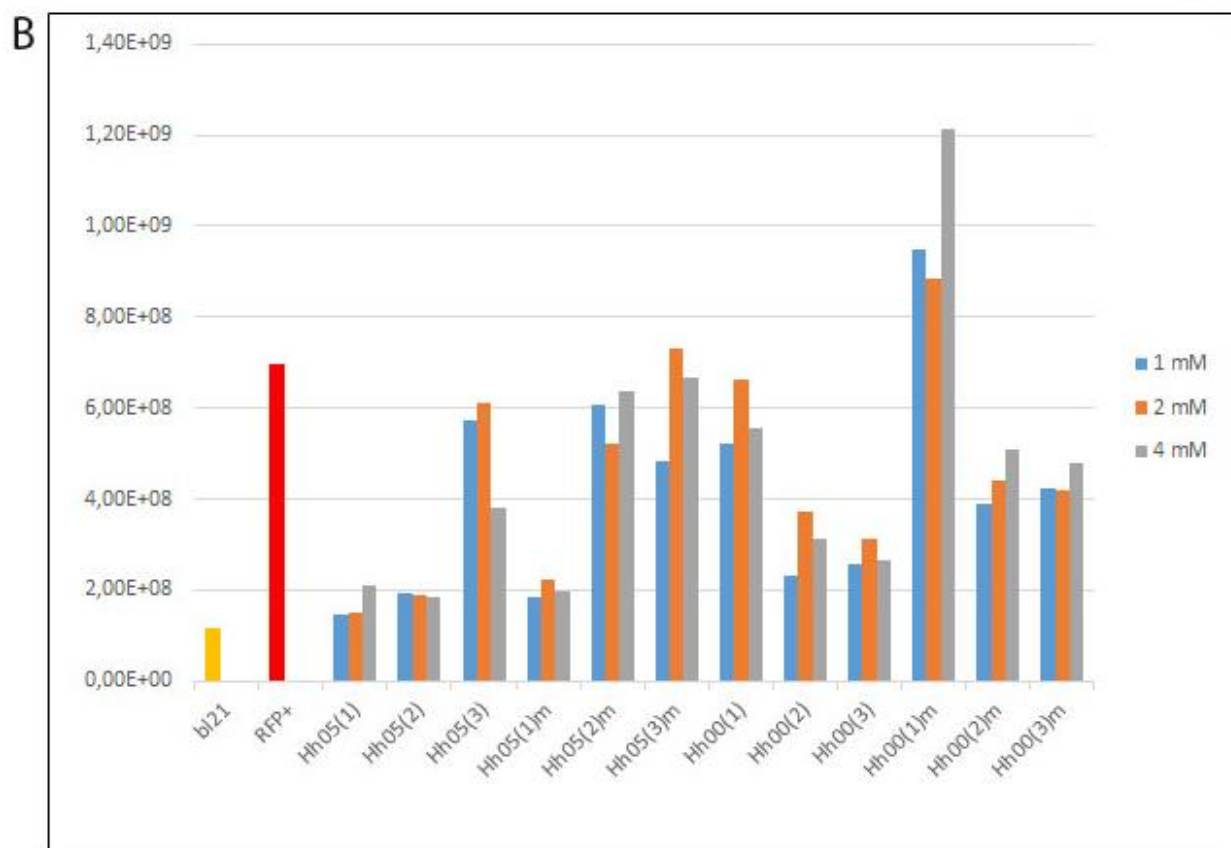
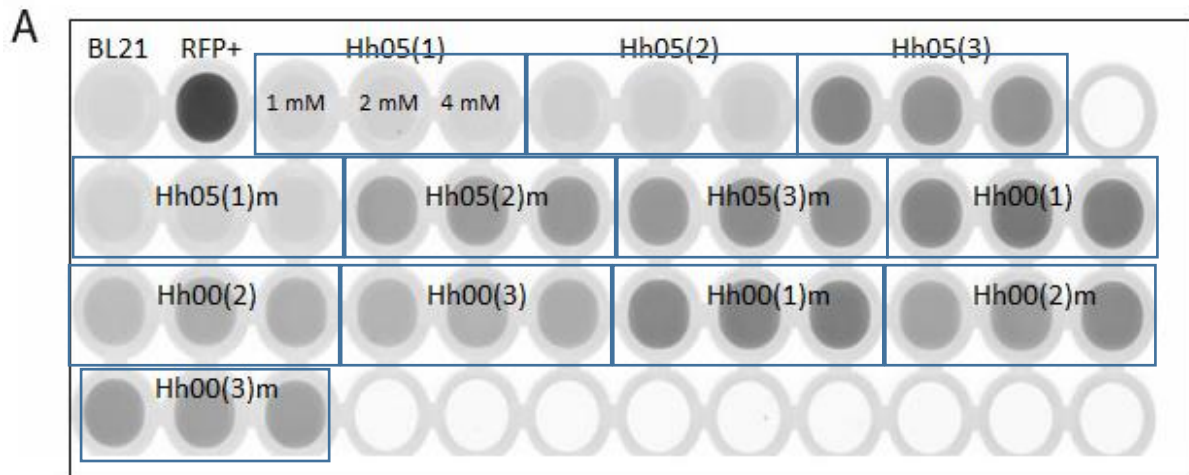


Figure 4.11: Mesure de la fluorescence émise par les bactéries après transformation.

Figure A :Le premier puits est la bactérie non transformée utilisé comme contrôle négatif (n'exprime pas le RFP), le deuxième est le contrôle positif contenant le gène du RFP non modifié. Pour le reste des puits, chaque trois puits représentent l'un des triplicats pour chaque ribozyme actif (Hh00 et Hh05) ou muté (Hh00(m) et Hh05(m) qui sont des contrôles négatifs inactifs) à trois concentrations différentes d'IPTG (1 mM, 2mM et 4 mM). Figure B : l'histogramme représente la fluorescence émise par les bactéries après transformation normalisé avec la DO dans le même ordre présenté que dans les puits.

Les résultats préliminaire représentés dans l'histogramme suggèrent que plusieurs clones des ribozymes actifs (hh05 (1 et 2) et hh00 (2 et 3)) montrent une réduction d'expression de RFP présumément due à la coupure par ces ribozymes en comparaison aux clones contrôles (hh05 muté (2 et 3) et hh00 muté 1). Les autres clones donnent des résultats inattendus ce qui peut être due aux mutations dans leurs séquences. Néanmoins pour confirmer ces résultats tous les clones ont été séquencés.

5 DISCUSSION

5.1. Partie Ribosoft :

5.1.1. Activité des ribozymes *in vitro* :

Le but de cette partie était de vérifier si les ribozymes en tête de marteau générés par le nouveau service web 'Ribosoft' sont actifs et spécifiques. Nous avons prouvé que 12 parmi 14 ribozymes conçus par Ribosoft sont actifs *in vitro* car ils sont capables de dégrader l'ARN de deux cibles différentes (RFP et ARN 16S) avec une efficacité élevée. Ainsi, notre hypothèse est confirmée en grande partie : Ribosoft est un moyen efficace pour la conception de ribozymes synthétiques pour dégrader n'importe quel ARN choisi et donc pour contrôler l'expression de n'importe quel gène que nous voudrions réprimer. En fait, ceci avait d'abord été testé sur un gène qui code pour une protéine mutée connue comme cause d'une maladie musculaire héréditaire, à savoir le PABPN1 donnant naissance à la protéine mutée causant la 'dystrophie musculaire oculo-pharyngée' (Brais, 2009). Ceci a également été fait par notre équipe en collaboration avec les équipes de Dr. Kharma et de Dr. Rouleau (Kharm *et al.*, 2016), mais tant qu'il y avait juste quatre ribozymes testés, et montrés comme actifs (Figure 5.1), ce n'était pas suffisant pour avoir une conclusion sur l'efficacité de Ribosoft. Nous avons donc confirmé ces résultats.

De plus, nous avons voulu vérifier s'il y avait une corrélation ou non entre les paramètres donnés par Ribosoft et l'activité des ribozymes. Pour cette raison, nous avons testé des ribozymes qui coupent au même site, mais qui appartiennent à des rangs différents donnés par ce dernier. (Résumé dans le tableau 20)

La seule corrélation que nous avons trouvée était que les ribozymes ayant une accessibilité 2 qui est égale à 0 ne sont pas actifs. C'est le cas des ribozymes 5(3) (contre RFP) et 7(4) (contre un segment de l'ARN 16S).

Tableau 20 : Comparaison des données expérimentales avec les paramètres de Ribosoft (Kharma *et al.*, 2016)

Ribozyme (rank)	Tm left	Tm right	Accessibility 1	Accessibility 2	Shape quality	Cleavage	Target
2(4)	45.39	35.39	0.38	0.546	0.315	+	RFP
4(1)	49.39	29.39	0.519	0.519	0.708	++	RFP
4(6)	39.39	31.39	0.624	0.519	0.241	++++	RFP
5(3)	40.97	36.97	0.62	0	0.651	-	RFP
7(1)	43.39	43.39	0.268	0.227	0.968	++	RFP
7(4)	43.29	33.39	0.281	0.227	0.912	++	RFP
9(1)	39.39	37.39	0.684	0.226	0.525	++++	RFP
9(7)	37.39	31.39	0.684	0.226	0.466	+++	RFP
11(1)	52.07	33.39	0.499	0.309	0.536	-/+	RFP
11(5)	39.39	35.39	0.648	0.309	0.284	-/+	RFP
A 2(1)	39.39	35.39	0.763	0.5	0.976	-	RFP
A 7(1)	41.39	43.39	0.635	0.236	0.953	++	RFP
A 9(4)	37.39	39.39	0.605	0.212	0.551	+	RFP
3(1)	31.39	29.39	0.645	0.652	1	++++	16S
7(4)	41.39	33.39	0.338	0	0.653	-	16S
7(m)						-	16S
5(m)						-	RFP

Légende : Ribozyme (*rank*) désigne le site du clivage du ribozyme et le rang donné par 'Ribosoft', Tm *right* et Tm *left* sont les Tm des brins droit (tige I) et gauche (tige III) du ribozyme, *accessibility* 1 et 2 sont les valeurs de l'accessibilité calculées de deux façons différentes par 'Ribosoft', *Shape quality* indique le bon repliement du ribozyme, *cleavage* indique le taux de clivage par le ribozyme représenté par '+'= actif ('++++' étant les plus actifs) et '-' = inactif.

Ribosoft génère des ribozymes qui ont des extrémités simples brins correspondant aux tiges I et III. Ces dernières présentent une complémentarité parfaite avec la séquence de l'ARN cible et c'est ce qui donne au ribozyme sa structure fonctionnelle.

Pour le reste des paramètres, nous ne pouvons pas tirer une conclusion car le nombre de ribozymes testé au total (14 contre l'ARN de RFP et trois contre la portion de l'ARN 16S) n'était pas suffisant pour faire les tests statistiques. Les 'tests student' que nous avons essayés avec différentes combinaisons n'étaient pas significatifs.

5.1.2. La combinaison :

L'essai de l'activité des ribozymes - chacun seul - et en les combinant par deux ou trois, a montré que l'utilisation de deux ribozymes ou plus est plus efficace pour un 'knockdown' du gène désiré car en combinant les trois ribozymes 4(6), 7(4) et 9(7) ensemble, le taux de clivage était de 100%. Ceci confirmait les résultats des ribozymes contre l'ARN du gène PABPN1 qui montrait que la combinaison de deux, trois ou quatre ribozymes augmente de plus en plus le

taux de dégradation de l'ARN, en atteignant 97% pour trois ribozymes et 98% pour quatre ribozymes (Figure 5.1) (Kharmar *et al.*, 2016).

Autre que les ribozymes de Ribosoft, la méthode de combinaison des ribozymes a été mentionnée dans plusieurs études. Comme exemple, la combinaison de trois ribozymes en tête de marteau dirigés contre une partie de l'ARNm de la survivin (une protéine inhibitrice de l'apoptose exprimée dans le cas de plusieurs cancers) avait un effet apoptotique sur les cellules cancéreuses médié par la diminution importante de l'expression de la protéine d'intérêt. Cela avait été prouvé *in vitro* et *in vivo* chez des souris (Fei *et al.*, 2008).

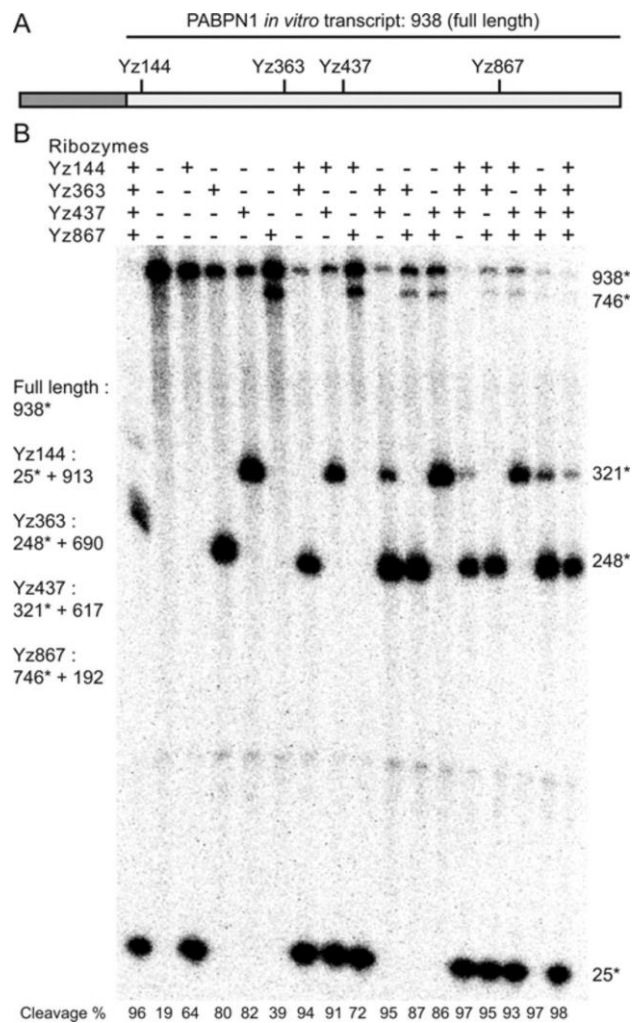


Figure 5.1: Le test des ribozymes conçus par Ribosoft contre le PABPN1.

A : une présentation schématique de l'ARN de PABPN1 avec les positions des sites de clivage ciblés par les ribozymes. **B** : le gel montre les résultats du clivage de l'ARN par les différents ribozymes, l'utilisation d'un ribozyme est indiquée par un '+' et son absence par un '-'. Les bandes les plus hautes sur le gel correspondent à l'ARN complet et celles plus basses sont les portions 5' de l'ARN clivé dont les tailles sont indiquées à droite du gel. Tiré de (Kharmar *et al.*, 2016).

5.1.3. Cinétique des ribozymes :

Des cinétiques de ribozymes ont été faites dans le but de comparer leurs activités afin de choisir les plus actifs pour les utiliser dans le circuit logique et aussi pour voir si le rang du ribozyme avait un effet sur son activité, tel qu'attendu du service web. Nous avons obtenu des résultats interprétables pour les ribozymes qui ciblent les sites GUC9 et GUC4, mais les résultats de ces deux ribozymes étaient contradictoires. Dans le cas du ribozyme 9 celui classé 1 par Ribosoft, était plus rapide, comparativement au ribozyme 9(7), tel qu'attendu. Par contre, dans le cas du ribozyme 4, celui qui est classé 6 était plus rapide que celui classé 1. Ceci nous laisse penser que le classement de Ribosoft n'indique pas vraiment l'efficacité du ribozyme. Ces résultats devraient néanmoins être re-vérifier car l'ARN de RFP n'avait pas une taille homogène, probablement parce qu'il était partiellement dégradé à cause d'une contamination aux ribonucléases ou parce que la transcription était incomplète. En effet, la purification d'un ARN intact de 1 kb s'est avérée difficile. Quant aux ribozymes testés contre l'ARN du gène PABPN1 un seul ribozyme par site avait été utilisé, ne permettant donc pas de comparaison ou de tirer une conclusion à propos du classement par rapport à l'activité des quatre ribozymes (Kharma *et al.*, 2016). (Figure 5.2)

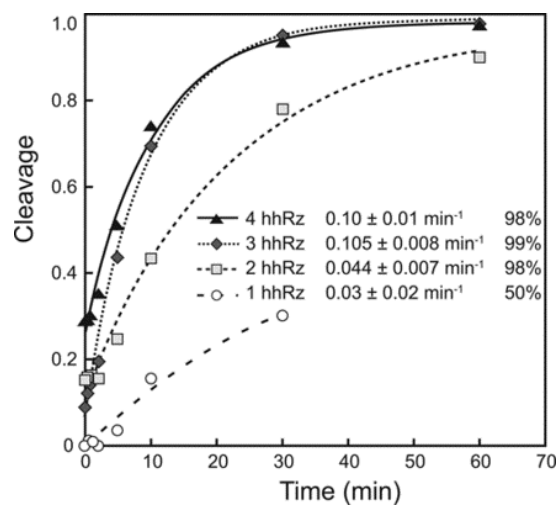


Figure5.2: Cinétique des ribozymes conçus contre le gène PABPN1.

L'activité d'un seul ribozyme, ainsi que des combinaisons de deux, trois et quatre ribozymes sont suivies pour comparer l'effet sur le taux du clivage de l'ARN et pour déterminer la constante de vitesse pour chaque test. Tiré de (Kharma *et al.*, 2016).

5.1.4. La spécificité des ribozymes conçus par Ribosoft :

La spécificité des ribozymes est importante surtout dans le cas des applications *in vivo* car en ciblant un seul gène dans une cellule ou un organisme nous ne voulons pas toucher à d'autres pouvant être d'intérêt vital, en ayant des séquences semblables à la cible. Ribosoft inclus donc

une option pour la spécificité qui calcule une valeur pour le 'off target' dans le cas où les ribozymes seront utilisés *in vivo*.

Dans notre projet, les ribozymes ont été testés *in vitro* avant de passer *in vivo*, c'est pour cette raison qu'il fallait tester leur spécificité en appliquant les ribozymes conçus contre l'ARN de RFP sur la portion de l'ARN 16S de *Microcystis aeruginosa*. Selon le résultat, ces expériences suggèrent que les ribozymes sont spécifiques et qu'ils ne clivent pas de façon inattendue des cibles auxquelles ils ne peuvent pas bien s'apparier. Cela est aussi confirmé par les résultats *in vivo* des ribozymes contre le PABPN1 qui n'étaient pas capable de dégrader l'ARNm de la protéine utilisée comme contrôle qui est l'actine (Figure 5.3). (Kharma *et al.*, 2016).

5.1.5. L'activité des ribozymes *in vivo*

Après avoir prouvé que les ribozymes étaient actifs *in vitro*, quelques ribozymes ont été choisis pour être testés *in vivo* mais le clonage n'a marché que pour un seul ribozyme qui est le 7(1). Il était clair à partir des résultats pour les ribozymes 4(1) et 9 (muté) (dont le clonage n'avait pas été réussi en réalité) que la transformation avec le plasmide sans insert induit la diminution de la fluorescence émise par la bactérie. La fluorescence de ces bactéries reste cependant plus élevée que celle exprimée par la bactérie contenant le ribozyme 7(1), ce qui permet de croire que ce dernier est actif et capable de dégrader l'ARNm de RFP. Ce résultat devrait être validé par les contrôles appropriés re-clonés et confirmé, de même que par un *Northern blot* afin de détecter l'expression du ribozyme.

Concernant la validation de l'efficacité de 'Ribosoft' pour générer des ribozymes actifs *in vivo*, cela avait déjà été fait dans des cellules humaines pour dégrader l'ARNm du gène PABPN1. Un *Western blot* montrait que la protéine était moins exprimée en présence des ribozymes, soit seuls ou en combinaison de deux (Figure 5.3) (Kharma *et al.*, 2016).

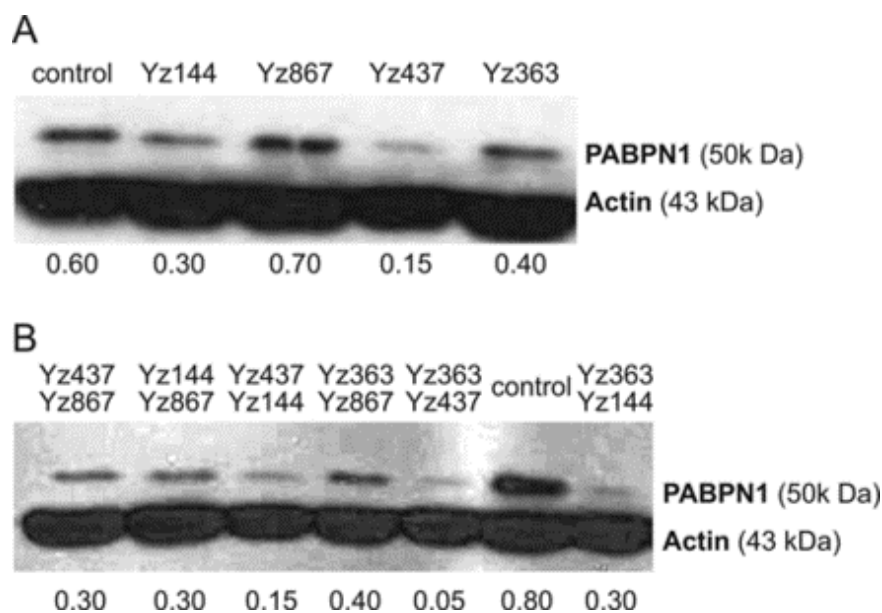


Figure 5.3: Le test des ribozymes contre le gène PABPN1 in vivo.

A : le taux d'expression de la protéine PABPN1 dans des cellules humaines sans et avec l'ajout de chaque ribozyme seul est détecté par un western blot et comparé au taux d'expression de l'actine dans les mêmes cellules. **B** : l'effet de différentes combinaisons de ribozymes. (Le contrôle montre des valeurs différentes (0.80 et 0.60) ce qui peut être dû à des différences entre les cultures cellulaires). Tiré de (Kharm et al., 2016).

Les ribozymes en tête de marteau ont été utilisés dans le cas de plusieurs maladies et ils ont prouvé leur efficacité *in vivo* soit dans des cellules ou dans des organismes, comme l'exemple des ribozymes conçus contre la survivin mentionnés précédemment. Dans un autre exemple, un ribozyme était utilisé contre HER2 dans le cancer du sein et induisait la diminution de la tumorigénicité des cellules cancéreuses (Mulhbach et al., 2010).

5.1.6. Ribosoft en comparaison avec les autres outils de conception de ribozymes

En conclusion, Ribosoft est un outil informatique développé de façon à permettre à l'utilisateur d'avoir plus de contrôle sur les paramètres de conception des ribozymes, ce qui le rend plus efficace en comparaison avec les autres services disponibles en ligne pour la conception des ribozymes en tête de marteau tels que 'Ribosubstrate' et 'Aladdin'.

Ribosubstrate est disponible sur le site du 'Riboclub' et a été développé en 2006 par Lucier et collaborateur (Lucier et al., 2006). Cet outil ne conçoit pas de ribozymes, mais utilise la séquence d'un ribozyme (ribozyme en tête de marteau, ribozyme SOFA-HDV ou siRNA) comme 'input' pour chercher des cibles d'ARN complémentaires, avec les tiges I et III dans le cas du ribozyme en tête de marteau, pour vérifier le potentiel de couper des cibles imprévues (Lucier et al., 2006) (Figure 5.4). Cette méthode requiert que l'utilisateur ait déjà choisi le site pour sa cible, et qu'il ait donc déjà conçu le ribozyme, au contraire de Ribosoft qui génère des

ribozymes automatiquement pour n'importe quel séquence ou gène choisi et qui fait ensuite une recherche similaire pour évaluer la spécificité *in vivo*.

A

Welcome to the RiboSubstrates application



B

Search for Hammerhead substrates

[Help](#) [Notes on databases](#)

Search Name:

cDNA Bank:

Stem I sequence

Stem I mismatch

Stem III sequence DA

Stem III mismatch


Email:

Send email when results are ready
 Wait for results here

Figure5.4: Capture d'écran du 'Ribosubstrate'.

A : l'utilisateur peut choisir l'un des trois ARN : SOFA-HDV, le ribozyme en tête de marteau ou le siRNA. B : le 'input' pour la recherche d'un ribozyme en tête de marteau : *search name* pour donner un nom à la recherche, *cDNA Bank* pour choisir une base de données, *stem I, III sequence* ; les séquences des tiges I et III, *stem I mismatch* : le nombre de mésappariements dans la tige I. Tiré de (Lucier et al. 2006).

Aladdin (seArch tool for hAmmerhead ribozyme DesIgN) est un outil informatique publié en 2012 pour faire le design de ribozymes en tête de marteau en utilisant le même principe que Ribosoft, mais il est basé sur une méthode computationnelle déjà utilisée (Mercatanti *et al.*, 2012). Bien que Aladdin soit efficace et facilite la conception de ribozymes contre des cibles choisies, ils présentent plusieurs inconvénients en comparaison avec 'Ribosoft'. Pour cet outil, le 'input' est seulement la séquence d'ARN à dégrader (Figure 5.5) alors que Ribosoft prend en considération plusieurs paramètres qui sont importants pour la génération des ribozymes, comme l'environnement dans lequel le ribozyme sera testé, la température, les concentrations des réactifs et le site de clivage souhaité (GUC étant utilisé par défaut), ainsi que la structure secondaire désirée pour le ribozyme, soit la minimale soit la complète. De plus, Aladdin n'a pas le paramètre 'off target' qui indique si le ribozyme est capable de cliver un autre ARN ou simplement de s'hybrider à l'ARN en bloquant sa traduction sans le dégrader. Les utilisateurs doivent donc faire une recherche de type BLAST pour effectuer cette vérification, ce qui rend la tâche plus lourde pour l'utilisateur. De plus, Aladdin ne classifie pas les ribozymes selon les valeurs des paramètres calculés lors de la conception, et ne donne pas de rangs aux ribozymes qui ciblent le même site (Figure 5.6).



Hammerhead Ribozyme List

Navigation:
[Home](#)
[Information](#)
[Contact](#)
[Credits](#)

User Name: sabrine

e-mail: sabrine_najah22@yahoo.fr

NCBI Accession Number:

Description:

Sequence:

AUUUUAUUAUUGGUGUCGCGAAAAAAAAAAAAAAAAUUGCGAGAACGCGUCACGCAUACG
 CAUCUGACGUACUACGUCACCGCGGGUCCCUAUUAUCUGUUCUCU

Figure5.5: Capture d'écran de l'étape d'entrée de l'ARN cible sur Aladdin.

L'entrée peut être le numéro d'accession du gène cible ou sa séquence.

Search Results:

NA°	Target Site		Binding & Energy (dGÅ° kcal/mol)		Accessibility Score		Uniqueness		Ribozyme		
	NUH	Position	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Sequence (dGÅ° kcal/mol)	Score	Structure
1	GUC	14	UGGUGU (-11.9)	GCGAAAA (-10.9)	68.1%	81.7%			UUUUCGCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACACCA (-11.3)	0.95	View
2	GUC	14	UGGUGU (-11.9)	GCGAAAA (-11.8)	68.1%	84.0%			UUUUUCGCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACACCA (-11.3)	0.95	View
3	GUC	14	UGGUGU (-11.9)	GCGAAAA (-12.7)	68.1%	85.8%			UUUUUCGCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACACCA (-11.3)	0.95	View
4	GUC	14	UGGUGU (-11.9)	GCGAAAA (-13.6)	68.1%	87.2%			UUUUUUUCGCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACACCA (-11.3)	0.95	View
5	GUC	14	UGGUGU (-11.9)	GCGAAAA (-14.5)	68.1%	88.4%			UUUUUUUCGCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACACCA (-11.3)	0.95	View
6	GUC	14	AUGGUGU (-13)	GCGAAAA (-10.9)	63.5%	81.7%			UUUUCGCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACACCAU (-11.3)	0.96	View
7	GUC	14	AUGGUGU (-13)	GCGAAAA (-11.8)	63.5%	84.0%			UUUUCGCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACACCAU (-11.3)	0.96	View
8	GUC	14	AUGGUGU (-13)	GCGAAAA (-12.7)	63.5%	85.8%			UUUUUCGCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACACCAU (-11.3)	0.96	View
9	GUC	14	AUGGUGU (-13)	GCGAAAA (-13.6)	63.5%	87.2%			UUUUUUUCGCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACACCAU (-11.3)	0.96	View
10	GUC	14	AUGGUGU (-13)	GCGAAAA (-14.5)	63.5%	88.4%			UUUUUUUCGCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACACCAU (-11.3)	0.96	View
11	GUC	14	UAUGGUGU (-14.3)	GCGAAAA (-10.9)	60.1%	81.7%			UUUUCGCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACACCAUA (-11.3)	0.96	View
12	GUC	14	UAUGGUGU (-14.3)	GCGAAAA (-11.8)	60.1%	84.0%			UUUUUCGCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACACCAUA (-11.3)	0.96	View
13	GUC	14	UAUGGUGU (-14.3)	GCGAAAA (-12.7)	60.1%	85.8%			UUUUUCGCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACACCAUA (-11.3)	0.96	View
14	GUC	14	UAUGGUGU (-14.3)	GCGAAAA (-13.6)	60.1%	87.2%			UUUUUUUCGCCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACACCAUA (-11.3)	0.96	View

Figure5.6: Capture d'écran de la page des résultats généré par Aladdin.

5.2. L'utilisation des ribozymes dans des opérations logiques :

5.2.1. L'effet de l'ajout de la séquence du *riboswitch* devant le ribozyme *in vitro* :

Le but ultime du projet était de construire des circuits logiques composés de deux *riboswitchs* qui contrôlent chacun un ribozyme afin de pouvoir contrôler l'expression d'un gène d'intérêt par les ribozymes, mais d'une façon réglable. Alors avant de passer à l'application directe *in vivo*, l'influence de l'ajout de la séquence de *riboswitch* à celle du ribozyme sur l'activité de ce dernier a été testée *in vitro*.

Le résultat montre que le ribozyme 4(1) perd plus de la moitié de son activité et le 9(1) la perd complètement. Ces résultats doivent être validés par d'autres répétitions, mais cette diminution ou perte de rendement des ribozymes est probablement due au fait que les séquences du *riboswitch* et du terminateur de part et d'autre des brins du ribozyme ont diminué sa capacité à s'hybrider à la cible, ce qui agit donc sur son efficacité. En effet, l'ajout de séquences peut agir sur le repliement du ribozyme en sa structure fonctionnelle qui inclut la formation du pseudo-nœud pouvant être inhibée par l'interaction des parties simple brin du ribozyme avec ceux du *riboswitch* ou encore par l'encombrement stérique potentiel occasionné par les structures additionnelles en aval et en amont.

Dans cette partie du projet, les tests n'ont pas dépassé la partie *in vitro*. Cependant, dans plusieurs autres études, le rendement du ribozyme généralement diminue lorsqu'il est modifié pour développer des ribozymes contrôlés par d'autres molécules d'ARN, des 'ribozymes allostériques'. Ceci est mentionné par Penchovsky et collaborateurs (Penchovsky & Breaker, 2005) qui ont inséré des '*binding oligonucleotides*' dans la tige III des ribozymes en tête de marteau. L'oligonucléotide inséré forme une tige IV en interaction avec la tige II et l'ajout dans

le milieu d'un oligo complémentaire au premier libère la tige II et le ribozyme obtient alors sa conformation fonctionnelle. Ceci était précédé par une étape de sélection de la séquence à insérer et de la position d'insertion pour diminuer au maximum l'effet négatif de cette insertion sur l'activité du ribozyme, ce qui a généré des ribozymes 1000 fois plus actifs *in vitro* par rapport aux ribozymes allostériques non-optimisés.

D'autres ribozymes en tête de marteau contrôlés par des aptamères, ont permis de créer des 'aptazymes' (Win & Smolke, 2007), mais selon notre revue de littérature, aucune étude n'a mentionné l'ajout d'un *riboswitch* complet pour réguler l'expression du ribozyme, ce qui présente l'originalité de notre travail. En fait, en principe, il serait beaucoup plus simple d'ajouter un *riboswitch* qui contrôle la transcription, via un terminateur par exemple, plutôt que de le combiner au ribozyme pour en faire un ribozyme allostérique (ce qui requiert une re-sélection de la fusion pour obtenir l'activité désirée). Ainsi, si on trouvait une façon d'ajouter le ribozyme en aval du *riboswitch* sans que l'activité du ribozyme n'en subisse l'impact, on pourrait théoriquement utiliser ce principe pour tous les *riboswitchs* connus.

Finalement, malgré les inconvénients rencontrés, il est probablement possible d'avoir de meilleurs résultats avec les tests *in vivo* car les ARN sont dans leur milieu physiologique ce qui devrait théoriquement permettre leur bon repliement en leurs structures attendues.

5.2.2. L'opération XOR :

En informatique et en électronique, l'opération XOR a généralement besoin de tout un circuit pour obtenir sa sortie finale, ce qui signifie qu'il n'existe pas une porte logique simple à laquelle nous pouvons donner deux entrées et nous attendre à avoir une sortie correspondant à la fonction XOR. Comme dans la Figure 5.7 (Shiv Shankar Mishra, 2010) il est nécessaire d'utiliser les entrées A, B, non A et non B et une porte logique NON pour obtenir A XOR B comme résultat.

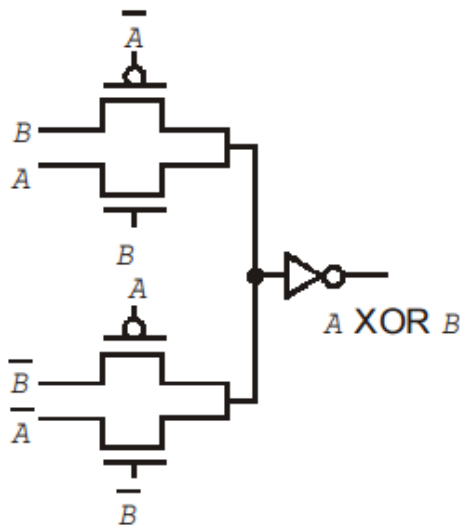


Figure 5.7: Le circuit logique construit pour répondre à la fonction XOR.

Tiré de (Shiv Shankar Mishra, 2010)

Même en biologie, l'application de cette opération avait jusqu'à maintenant besoin de l'utilisation de différentes portes logiques pour l'atteindre, comme dans le cas du circuit logique développé par Gerasimova et collaborateurs (Gerasimova & Kolpashchikov, 2012) basé sur l'ADN, en utilisant deux portes logiques ET, deux portes NON et une porte OU pour appliquer le principe de l'opération XOR. Dans ce circuit les sorties des portes NON1 et NON2 sont considérées comme des entrées par les portes ET1 et ET2 et les sorties de ces derniers sont les entrées de la porte OU qui va donner le résultat final (Figure 5.8).

Une autre étude (Stojanovic, 2009) utilisait deux déoxyribozymes qui jouaient le rôle d'une 'porte ET' et une 'porte NON' pour correspondre à la 'porte XOR'.

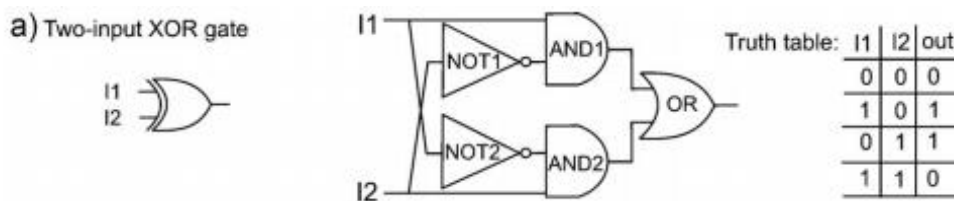


Figure 5.8: Un circuit logique construit par l'ADN pour valider l'opération XOR.

Tiré de (Gerasimova & Kolpashchikov, 2012)

Dans le cadre de ce projet l'opération logique a été simplifiée avec une application directe de la fonction XOR sans le passage par des intermédiaires par l'usage de deux ribozymes (XOR A et XOR B) conçus par 'Ribosoft' contre l'ARNm de RFP et auxquels des séquences complémentaires ont été ajoutées aux extrémités 3' et 5' (Figure 3.3). Le principe est qu'en

présence d'un ARN ou de l'autre, l'ARN de RFP sera dégradé, mais en présence des deux, les ribozymes s'hybrideront l'un à l'autre par complémentarité de séquences, ce qui inhibera leurs activités et résultera en un ARN de RFP intact.

Le principe a été testé *in vitro* et les résultats montraient que les ribozymes XOR A ou XOR B seuls donnent un taux de clivage beaucoup plus important que lorsque les deux sont mis en même temps en présence de l'ARN cible. Ce résultat supporte seulement partiellement notre hypothèse car nous nous attendions à avoir une inhibition réciproque presque totale des ribozymes XOR. Cela est tout de même encourageant, surtout en considérant que notre démarche était beaucoup plus simple que ce qui a été fait avant et l'inhibition peut potentiellement être améliorée par l'ajout de plus de complémentarité entre les séquences des ribozymes, sans affecter leurs activités quand chacun d'eux est isolé.

5.3. Partie Enzymer :

Enzymer est un outil informatique qui sert à concevoir de nouveaux ARN à partir de structures secondaires connues par l'approche appelée '*inverse folding*'. L'originalité de ce programme est qu'il prend en considération les pseudo-nœuds en utilisant de nouveaux paramètres par rapport à ceux développés avant (Zandi *et al.*, 2016). En effet, les pseudonœuds représentent un défi important du point de vue de la prédiction informatique et requiert des algorithmes très différents nécessitant un temps de calcul des ordres de grandeur plus grand que des structures simplement constituées de tiges-boucles.

5.3.1. Activité des ribozymes *in vitro* :

La structure secondaire d'un ribozyme en tête de marteau de type I trouvé dans le métagénome de la souris a été utilisée comme matrice pour générer de nouveaux ribozymes avec des séquences pour lesquelles il n'y a que le cœur catalytique qui est conservé.

Treize ribozymes ont été testés et leurs capacités d'auto-clivage ont été comparées à celle du ribozyme WT et à une version inactive mutée. A part deux ribozymes qui avaient des taux de clivage de 41 et 55%, le reste avait une activité comparable à celle du ribozyme WT. Comme le ribozyme muté n'avait qu'un taux de clivage de 21%, les taux très supérieurs des autres ribozymes supportent le fait qu'il s'agissait bien de l'activité catalytique des ribozymes.

Ces résultats montraient que 'Enzymer' a réussi la conception du pseudo-nœud, qui est indispensable pour le bon fonctionnement de ce ribozyme en tête de marteau. Ceci nous a guidé à tester un autre type de ribozyme avec une structure plus complexe qui est le ribozyme GImS, mais les résultats n'étaient pas concluants.

5.3.2. Activité des ribozymes *in vivo* :

Après avoir prouvé que les ribozymes en tête de marteau étaient actifs *in vitro*, nous avons voulu tester leur activité *in vivo*, mais en jouant sur la séquence pour concevoir un ribozyme formé de deux parties : une partie noncodante et une partie incluse dans la séquence codante de RFP. Quatre ribozymes ont été testés, dont deux qui étaient supposés être actifs (hhd00 et hhd05) et deux autres mutés dans la séquence du cœur catalytique (hh00m et hh05m).

Les résultats de cette partie n'étaient pas concluants car le résultat de séquençage a montré que plusieurs des séquences des ribozymes obtenues après le clonage avaient des mutations imprévues. Dans tous les cas, ces résultats ne sont pas définitifs car le test n'a été fait qu'une seule fois et ne permet pas de conclure sur l'efficacité de 'Enzymer' dans ce contexte-ci. Cependant, l'idée du projet reste originale car selon nos connaissances, jamais une étude n'a utilisé un ribozyme en tête de marteau dans la séquence codante pour avoir un contrôle direct sur l'expression génique sans avoir besoin d'inclure un autre gène ou d'autres régions régulatrices complètement en amont ou en aval. Ceci donne une alternative qui permet des constructions plasmidiques plus compactes avec un moindre coût de construction et un minimum de perte d'énergie pour la cellule. En plus en utilisant un aptazyme ou un ribozyme GImS au lieu de simplement un ribozyme en tête de marteau nous pouvons avoir plus de contrôle sur l'expression génique en l'induisant ou en l'inhibant selon notre choix.

En ce qui concerne 'Enzymer' utilise une méthodologie de '*inverse folding*' plus développée par rapport à celle utilisée par les autres programmes 'MODENA' (Taneda, 2012) et 'antaRNA' (Kleinkauf *et al.*, 2015) qui font le même travail de conception en prenant en considération les pseudo-nœuds. Enzymer montre une meilleure performance sur plusieurs niveaux comme le temps d'exécution, les séquences générées qui ont des meilleures valeurs de thermostabilité, '*ensemble defect*', '*Boltzman frequency*' et le programme atteint les critères voulus après un minimum d'itérations. En plus, Enzymer est le premier algorithme capable de générer des séquences d'un ARN complexe qui a plusieurs brins et un pseudo-nœud en même temps, comme le ribozyme GImS.

6 CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

Le but ultime du projet était de tester trois nouveaux concepts : 1- analyser l'efficacité et la robustesse de Ribosoft. 2-Développer un circuit logique basé seulement sur l'ARN pour contrôler l'expression d'un gène choisi en se basant sur des ribozymes synthétiques. 3- Tester'il est possible d'assembler deux séquences d'ARN ayant des fonctions différentes en une seule. Cela a été fait en combinant la séquence d'un ribozyme en tête de marteau à une séquence codante.

Ainsi, nous avons pu prouver que les ribozymes conçus par Ribosoft sont actifs *in vitro* et *in vivo* car ils étaient capables de dégrader l'ARN cible, en plus ils semblent être spécifiques, ce qui diminue le risque d'affecter d'autres gènes *in vivo*. Ces ribozymes peuvent être utilisés pour différentes applications dans le contrôle des gènes dans les cellules procaryotes. Entre autre, les bactéries utilisées dans les industries chimiques ou pharmaceutiques pour la production de certains produits peuvent être modifiées par des ribozymes ciblant une série de gènes appropriés afin de diriger une voie métabolique dans un sens désiré. Par exemple, des ribozymes dégradant des gènes codant pour des enzymes qui convertissent des intermédiaires métaboliques nécessaires pour la synthèse de notre molécule d'intérêt en une autre molécule favoriseraient la voie métabolique correspondant à la molécule recherchée. Dans les cellules eucaryotes, ces ribozymes pourraient être appliqués comme thérapie génique pour des maladies causées par plus qu'un gène muté ou la surexpression de plusieurs protéines en développant des circuits logiques à l'aide de ces ribozymes. Et ceci est facilité par la simplicité de leur conception et leur spécificité. De plus, le contrôle de leur activité peut potentiellement être fait par des aptamères et des promoteurs.

En plus, cette technologie présente quelques avantages par rapport à celles existantes comme les petits ARN interférents (siRNA) qui ne sont actifs que dans les cellules eucaryotes et le système CRISPR qui inhibe complètement l'expression d'un gène choisi par un '*knockout*' et dont le contrôle de l'inhibition n'est possible qu'à l'aide de certaines protéines inhibitrices qui ne sont pas fonctionnelles pour tous les types de ce système. Comme le cas type I-F du système CRISPR, les protéines Acrf1 et Acrf2 qui interagissent avec le complexe Csy (CRISPR system yersinia) formé par quatre protéines Cas (Csy 1,2, 3 et 4) et un crRNA ce qui empêche alors l'interaction de ce système avec l'ADN cible et l'Acrf3 qui lie la Cas3 (une nucléase-hélicase qui dégrade l'ADN cible) en bloquant sa liaison au complexe CRISPR-Cas. (Bondy-Denomy *et al.*, 2015). Ce mode d'inhibition est unique au type I du système CRISPR alors que le système II est inhibé par des protéines qui interagissent avec la cas 9 pour empêcher le clivage d'ADN (Pawluk *et al.*, 2016).

En outre, ces deux systèmes (CRISPR et siRNA) incluent des protéines pour leurs fonctionnements, ce qui nécessite plus de matériel, d'énergie et de temps pour la cellule à synthétiser en comparaison avec l'ARN noncodant qui est dans ce cas le ribozyme n'ayant besoin de rien pour son fonctionnement ce qui facilite son test *in vitro*.

Pour ce qui est de contrôle de l'activité du ribozyme par un riboswitch face au temps limité et à quelque difficulté technique, les tests n'ont pas été faits *in vivo* et la seule chose qui a été faite c'est le test de l'effet de l'ajout du *riboswitch* au ribozyme, qui diminue le rendement du ribozyme ou même l'inhibe complètement, mais ceci reste à valider par d'autres essais *in vitro* et *in vivo*.

Concernant les opérations logiques, nous nous sommes concentrés sur l'opération 'OU exclusive' qui a été réalisée en utilisant deux ribozymes qui s'hybrident par complémentarité de séquence, ce qui empêche la dégradation de l'ARN cible par les dits ribozymes. Le résultat obtenu est encourageant et il reste à améliorer la fonctionnalité de l'opérateur logique moléculaire pour avoir une inhibition presque totale de l'activité des ribozymes. Ceci pourra être amélioré en jouant sur les séquences des ribozymes pour avoir plus de complémentarité et il reste à prouver le concept *in vivo*.

Une application future de cette opération logique est le développement d'un biosenseur qui peut détecter la présence de deux molécules simultanément en émettant un signal seulement en présence de ces deux molécules et qui peut être utilisé à des fins de diagnostic médical ou dans l'environnement. Ceci peut être fait en ajoutant des aptamères ou des riboswitchs spécifiques aux molécules qu'on désire détecter pour activer l'expression des ribozymes qui eux même dégradent l'ARN d'une protéine fluorescente, alors en présence d'une seule molécule la fluorescence est soit diminuée ou dégradée, mais en présence des deux molécules cibles les ribozymes s'hybrident et la fluorescence est exprimée normalement.

Il est aussi possible de combiner plusieurs opérations logiques pour développer une sorte de 'médicament intelligent' qui agit par un principe de diagnostic intelligent résultant par des mécanismes d'autodestruction des cellules. Pour appliquer ceci, des conditions doivent être fixées dès le début comme, en présence de A ET B et NON C, les ARN vont agir d'une certaine façon. Donc, l'activité de plusieurs ARN noncodants peut être combinée pour avoir :1- la partie du système qui fait la détection, des ARN capables de détecter le seuil d'expression de plusieurs molécules (comme des aptamères) et c'est ce qui répond aux conditions des opérations logiques pour ainsi poser un diagnostic. Et dépendamment du taux des molécules, les détecteurs vont agir sur l'expression des ARN effecteurs (ribozymes, ARN interférents, introns...) qui vont causer l'inhibition de l'expression des protéines indispensables à la survie de la cellule causant alors sa destruction.

Pour la deuxième partie, les ribozymes en tête de marteau générés par le programme 'enzymier' ont montré une activité *in vitro*, mais les résultats pour le ribozyme GImS n'étaient pas clairs pour permettre de tirer une conclusion.

Le deuxième concept à tester était le contrôle de l'expression génique par un ribozyme inclus dans la séquence codante de la RFP. Les résultats sont encourageants, car dans quelques cas la fluorescence exprimée diminue. Cependant, beaucoup reste à faire pour confirmer ces résultats.

Plusieurs ARN noncodants ont montré leur efficacité dans des domaines comme la biologie synthétique, comme exemple l'utilisation de petits ARN pour diminuer l'expression des gènes inclus dans une voie métabolique afin de l'orienter vers la synthèse d'une molécule désirée (Na *et al.*, 2013). Aussi, les ARN noncodants ont été amplement utilisés pour développer des thérapies géniques comme des ribozymes allostériques contre le cancer, ou pour dégrader les ARN viraux et le système CRISPR qui a été inséré dans des cellules germinales pluripotentes pour inclure des mutations dans des gènes causant des maladies comme la polykystose rénale (Freedman *et al.*, 2015).

En fait, avoir la capacité de combiner deux séquences ayant des fonctions différentes permet de créer de nouvelles fonctions interdépendantes comme l'exemple que nous avons testés qui fait que la traduction d'une séquence codante dépend d'un ribozyme. Le même principe peut être appliqué en utilisant d'autres ARN noncodant, comme les riboswitchs, avec des séquences codantes. Aussi, la combinaison peut être faite entre des ARN de même type, en assemblant deux ou plusieurs riboswitchs répondant à différentes molécules en un seul ayant plusieurs aptamères et une seule plateforme d'expression.

En conclusion, ce travail a mis l'accent sur l'utilité de quelques ARN noncodants (les ribozymes et les riboswitch) et a proposé une façon de les combiner entre eux afin de les utiliser pour le développement d'un circuit logique ou avec une séquence codante pour contrôler l'expression d'un gène.

7 REFERENCES :

- Aadleman LM (1994) Molecular Computation of Solutions to Combinatorial Problems. *Science* 266(5187):1021-1024.
- Alberts B JA, Lewis J, et al (2002) How Cells Read the Genome: From DNA to Protein. *Molecular biology of the cell*, Alberts B, Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (Édit.) Garland Science, New York.
- Andrianantoandro E, Basu S, Karig DK & Weiss R (2006) Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. *Molecular systems biology* 2:2006 0028.
- Bai J, Banda N, Lee NS, Rossi J & Akkina R (2002) RNA-based anti-HIV-1 gene therapeutic constructs in SCID-hu mouse model. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 6(6):770-782.
- Barrick JE & Breaker RR (2007) The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome biology* 8(11).
- Bayer TS & Smolke CD (2005) Programmable ligand-controlled riboregulators of eukaryotic gene expression. *Nature biotechnology* 23(3):337-343.
- Belitsky BR (2002) Biosynthesis of amino acids of the glutamate and aspartate families, alanine, and polyamines. in *BACILLUS SUBTILIS AND ITS CLOSEST RELATIVES: FROM GENES TO CELLS* (ASM paper, Washington, D.C), p 203–231.
- Benenson Y (2009) Biocomputers: from test tubes to live cells. *Molecular bioSystems* 5(7):675-685.
- Benenson Y, Gil B, Ben-Dor U, Adar R & Shapiro E (2004) An autonomous molecular computer for logical control of gene expression. *Nature* 429(6990):423-429.
- Blouin S, Chinnappan R & Lafontaine DA (2011) Folding of the lysine riboswitch: importance of peripheral elements for transcriptional regulation. *Nucleic acids research* 39(8):3373-3387.
- Blount KF & Uhlenbeck OC (2005) The structure-function dilemma of the hammerhead ribozyme. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 34:415-440.
- Bondy-Denomy J, Garcia B, Strum S, Du M, Rollins MF, Hidalgo-Reyes Y, Wiedenheft B, Maxwell KL & Davidson AR (2015) Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins. *Nature* 526(7571):136-139.
- Brais B (2009) Oculopharyngeal muscular dystrophy: a polyalanine myopathy. *Current neurology and neuroscience reports* 9(1):76-82.
- Breaker RR (2011) Prospects for riboswitch discovery and analysis. *Molecular cell* 43(6):867-879.
- Cech TR (1986) A model for the RNA-catalyzed replication of RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(12):4360-4363.
- Cheah MT, Wachter A, Sudarsan N & Breaker RR (2007) Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature* 447(7143):497-U497.
- Cheng J, Luo J, Zhang X, Hu J, Hui H, Wang C & Stern A (2000) Inhibition of cell proliferation in HCC-9204 hepatoma cells by a c-myc specific ribozyme. *Cancer gene therapy* 7(3):407-412.
- Collins JA, Irnov I, Baker S & Winkler WC (2007) Mechanism of mRNA destabilization by the glmS ribozyme. *Genes & development* 21(24):3356-3368.
- Croft MT, Moulin M, Webb ME & Smith AG (2007) Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(52):20770-20775.
- Dahm R (2005) Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental biology* 278(2):274-288.
- Dahm SC, Derrick WB & Uhlenbeck OC (1993) Evidence for the role of solvated metal hydroxide in the hammerhead cleavage mechanism. *Biochemistry* 32(48):13040-13045.
- Dahm SC & Uhlenbeck OC (1991) Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry* 30(39):9464-9469.
- De la Pena M, Gago S & Flores R (2003) Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *Embo Journal* 22(20):5561-5570.
- de la Pena M & Garcia-Robles I (2010) Intronic hammerhead ribozymes are ultraconserved in the human genome. *EMBO reports* 11(9):711-716.

- Dirks RM, Lin M, Winfree E & Pierce NA (2004) Paradigms for computational nucleic acid design. *Nucleic acids research* 32(4):1392-1403.
- Drenser KA, Timmers AM, Hauswirth WW & Lewin AS (1998) Ribozyme-targeted destruction of RNA associated with autosomal-dominant retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science* 39(5):681-689.
- Endy D (2005) Foundations for engineering biology. *Nature* 438(7067):449-453.
- Fei Q, Zhang HY, Fu LL, Dai XL, Gao BM, Ni M, Ge C, Li JJ, Ding X, Ke YW, Yao XB & Zhu JD (2008) Experimental cancer gene therapy by multiple anti-survivin hammerhead ribozymes. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 40(6):466-477.
- Freedman BS, Brooks CR, Lam AQ, Fu H, Morizane R, Agrawal V, Saad AF, Li MK, Hughes MR, Werff RV, Peters DT, Lu J, Baccei A, Siedlecki AM, Valerius MT, Musunuru K, McNagny KM, Steinman TI, Zhou J, Lerou PH & Bonventre JV (2015) Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nature communications* 6:8715.
- Gelfand MS, Mironov AA, Jomantas J, Kozlov YI & Perumov DA (1999) A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes. *Trends in Genetics* 15(11):439-442.
- Gerasimova YV & Kolpashchikov DM (2012) Connectable DNA Logic Gates: OR and XOR Logics. *Chem-Asian J* 7(3):534-540.
- Gold L, Brown D, He Y, Shtatland T, Singer BS & Wu Y (1997a) From oligonucleotide shapes to genomic SELEX: novel biological regulatory loops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(1):59-64.
- Gold L, Singer B, He YY & Brody E (1997b) SELEX and the evolution of genomes. *Current opinion in genetics & development* 7(6):848-851.
- Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N & Altman S (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35(3 Pt 2):849-857.
- Hammann C, Luptak A, Perreault J & de la Pena M (2012) The ubiquitous hammerhead ribozyme. *RNA* 18(5):871-885.
- Haseloff J & Gerlach WL (1989) Sequences required for self-catalysed cleavage of the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Gene* 82(1):43-52.
- Hedberg A & Johansen SD (2013) Nuclear group I introns in self-splicing and beyond. *Mobile DNA* 4(1):17.
- Imane R (2016) *Optimisation de la production d'acide succinique chez methylobacterium extorquens par le biais de petits arn regulateurs*. M. Sc. (Quebec University). 86 p(Consulté le April 2016)
- Isaacs FJ, Dwyer DJ & Collins JJ (2006) RNA synthetic biology. *Nature biotechnology* 24(5):545-554.
- Jacob F & Monod J (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology* 3:318-356.
- Kharma N, Varin L, Abu-Baker A, Ouellet J, Najeh S, Ehdavevand MR, Belmonte G, Ambri A, Rouleau G & Perreault J (2016) Automated design of hammerhead ribozymes and validation by targeting the PABPN1 gene transcript. *Nucleic acids research* 44(4):e39.
- Khvorova A, Lescoute A, Westhof E & Jayasena SD (2003) Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nature structural biology* 10(9):708-712.
- Kim JN & Breaker RR (2008) Purine sensing by riboswitches. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 100(1):1-11.
- Kleinkauf R, Houwaart T, Backofen R & Mann M (2015) antaRNA--Multi-objective inverse folding of pseudoknot RNA using ant-colony optimization. *BMC bioinformatics* 16:389.
- Kochhar S & Paulus H (1996) Lysine-induced premature transcription termination in the lysC operon of *Bacillus subtilis*. *Microbiol-Uk* 142:1635-1639.
- Laing C & Schlick T (2011) Computational approaches to RNA structure prediction, analysis, and design. *Current opinion in structural biology* 21(3):306-318.
- Lambowitz AM & Zimmerly S (2011) Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3(8):a003616.

- Lee TS, Silva Lopez C, Giambasu GM, Martick M, Scott WG & York DM (2008) Role of Mg²⁺ in hammerhead ribozyme catalysis from molecular simulation. *Journal of the American Chemical Society* 130(10):3053-3064.
- Liao HH & Hseu TH (1998) Analysis of the regulatory region of the lysC gene of Escherichia coli. *FEMS microbiology letters* 168(1):31-36.
- Loh E, Dussurget O, Gripenland J, Vaitkevicius K, Tiensuu T, Mandin P, Repoila F, Buchrieser C, Cossart P & Johansson J (2009) A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 139(4):770-779.
- Lucier JF, Bergeron LJ, Briere FP, Ouellette R, Abou Elela S & Perreault JP (2006) RiboSubstrates: a web application addressing the cleavage specificities of ribozymes in designated genomes. *BMC bioinformatics* 7.
- Mader U, Homuth G, Scharf C, Buttner K, Bode R & Hecker M (2002) Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression modulated by amino acid availability. *Journal of bacteriology* 184(15):4288-4295.
- Mandal M, Lee M, Barrick JE, Weinberg Z, Emilsson GM, Ruzzo WL & Breaker RR (2004) A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression (vol 306, pg, 275, 2004). *Science* 306(5701):1477-1477.
- Martick M, Horan LH, Noller HF & Scott WG (2008) A discontinuous hammerhead ribozyme embedded in a mammalian messenger RNA. *Nature* 454(7206):899-902.
- Martick M & Scott WG (2006) Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell* 126(2):309-320.
- Mattick JS & Makunin IV (2006) Non-coding RNA. *Human molecular genetics* 15 Spec No 1:R17-29.
- McKay DB (1996) Structure and function of the hammerhead ribozyme: an unfinished story. *RNA* 2(5):395-403.
- Mercatanti A, Lande C & Citti L (2012) A computational approach to predict suitable target sites for trans-acting minimal hammerhead ribozymes. *Methods Mol Biol* 848:337-356.
- Miranda-Rios J, Navarro M & Soberon M (2001) A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(17):9736-9741.
- Mok W & Li YF (2008) Recent Progress in Nucleic Acid Aptamer-Based Biosensors and Bioassays. *Sensors-Basel* 8(11):7050-7084.
- Montange RK & Batey RT (2006) Structure of the S-adenosylmethionine riboswitch regulatory mRNA element. *Nature* 441(7097):1172-1175.
- Mulhbacher J, St-Pierre P & Lafontaine DA (2010) Therapeutic applications of ribozymes and riboswitches. *Current opinion in pharmacology* 10(5):551-556.
- Na D, Yoo SM, Chung H, Park H, Park JH & Lee SY (2013) Metabolic engineering of Escherichia coli using synthetic small regulatory RNAs. *Nature biotechnology* 31(2):170-174.
- Nahvi A, Sudarsan N, Ebert MS, Zou X, Brown KL & Breaker RR (2002) Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chemistry & biology* 9(9):1043.
- Noller HF, Hoffarth V & Zimniak L (1992) Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 256(5062):1416-1419.
- Patte JC, Akrim M & Mejean V (1998) The leader sequence of the Escherichia coli lysC gene is involved in the regulation of LysC synthesis. *FEMS microbiology letters* 169(1):165-170.
- Pawluk A, Amrani N, Zhang Y, Garcia B, Hidalgo-Reyes Y, Lee J, Edraki A, Shah M, Sontheimer EJ, Maxwell KL & Davidson AR (2016) Naturally Occurring Off-Switches for CRISPR-Cas9. *Cell* 167(7):1829-1838 e1829.
- Penchovsky R & Breaker RR (2005) Computational design and experimental validation of oligonucleotide-sensing allosteric ribozymes. *Nature biotechnology* 23(11):1424-1433.
- Perreault J, Weinberg Z, Roth A, Popescu O, Chartrand P, Ferbeyre G & Breaker RR (2011) Identification of Hammerhead Ribozymes in All Domains of Life Reveals Novel Structural Variations. *PLoS computational biology* 7(5).

- Pley HW, Flaherty KM & McKay DB (1994) Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature* 372(6501):68-74.
- Prody GA, Bakos JT, Buzayan JM, Schneider IR & Bruening G (1986) Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* 231(4745):1577-1580.
- Sakamoto N, Wu CH & Wu GY (1996) Intracellular cleavage of hepatitis C virus RNA and inhibition of viral protein translation by hammerhead ribozymes. *The Journal of clinical investigation* 98(12):2720-2728.
- Saldanha R, Mohr G, Belfort M & Lambowitz AM (1993) Group I and group II introns. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7(1):15-24.
- Schuchardt U RS, and Rogério Matheus Vargas*b (1998) Transesterification of Vegetable Oils: a Review. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 9.
- Schultz EP, Vasquez EE & Scott WG (2014) Structural and catalytic effects of an invariant purine substitution in the hammerhead ribozyme: implications for the mechanism of acid-base catalysis. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 70(Pt 9):2256-2263.
- Scott WG (2010) What can the New Hammerhead Ribozyme Structures Teach us About Design? *RNA Technologies and Their Applications*, V.A. Erdmann JB (Édit.)Springer. p 305-324.
- Scott WG, Finch JT & Klug A (1995) The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme. *Nucleic acids symposium series* (34):214-216.
- Scott WG, Horan LH & Martick M (2013) The hammerhead ribozyme: structure, catalysis, and gene regulation. *Progress in molecular biology and translational science* 120:1-23.
- Scott WG & Klug A (1996) Ribozymes: structure and mechanism in RNA catalysis. *Trends in biochemical sciences* 21(6):220-224.
- Scott WG, Murray JB, Arnold JR, Stoddard BL & Klug A (1996) Capturing the structure of a catalytic RNA intermediate: the hammerhead ribozyme. *Science* 274(5295):2065-2069.
- Serganov A & Nudler E (2013) A decade of riboswitches. *Cell* 152(1-2):17-24.
- Shapiro E & Gil B (2008) RNA computing in a living cell. *Science* 322(5900):387-388.
- Shiv Shankar Mishra AKAARKN (2010) A comparative performance analysis of various CMOS design techniques for XOR and XNOR circuits *International Journal on Emerging Technologies*.
- Stage-Zimmermann TK & Uhlenbeck OC (1998) Hammerhead ribozyme kinetics. *RNA* 4(8):875-889.
- Steitz TA & Moore PB (2003) RNA, the first macromolecular catalyst: the ribosome is a ribozyme. *Trends in biochemical sciences* 28(8):411-418.
- Stojanovic JMaMN (2009) Nucleic acids for computation. *Functional nucleic acids for analytical applications* Yingfu Li YL (Édit.) Springer Science + Business Media. p 355-375.
- Stormo GD & Ji YM (2001) Do mRNAs act as direct sensors of small molecules to control their expression? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(17):9465-9467.
- Sudarsan N, Wickiser JK, Nakamura S, Ebert MS & Breaker RR (2003) An mRNA structure in bacteria that controls gene expression by binding lysine. *Genes & development* 17(21):2688-2697.
- Sussman TFKaJGJ (1998) Cellular Gate Technology. *In proceedings of UMC98: First International Conference On Unconventional Models Of Computation. Discrete Mathematics and Theoretical Computer Science Series*
- :257-272.
- Taneda A (2012) Multi-objective genetic algorithm for pseudoknotted RNA sequence design. *Frontiers in genetics* 3:36.
- Tinder RF (2000) Background for Digital Design. *Engineering Digital Design*, Academic Press, United States of America, 2 Ed. p 79-130.
- Tucker BJ & Breaker RR (2005) Riboswitches as versatile gene control elements. *Current opinion in structural biology* 15(3):342-348.
- Uhlenbeck OC (1987) A Small Catalytic Oligoribonucleotide. *Nature* 328(6131):596-600.
- Voigt CA (2006) Genetic parts to program bacteria. *Current opinion in biotechnology* 17(5):548-557.

- Watson JD, Crick, F.H.C. (1953) A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171:737 – 738.
- Win MN, Liang JC & Smolke CD (2009) Frameworks for Programming Biological Function through RNA Parts and Devices. *Chemistry & biology* 16(3):298-310.
- Win MN & Smolke CD (2007) A modular and extensible RNA-based gene-regulatory platform for engineering cellular function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(36):14283-14288.
- Winkler WC, Nahvi A, Roth A, Collins JA & Breaker RR (2004) Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* 428(6980):281-286.
- Winkler WC, Nahvi A, Sudarsan N, Barrick JE & Breaker RR (2003) An mRNA structure that controls gene expression by binding S-adenosylmethionine. *Nature structural biology* 10(9):701-707.
- Wright O, Delmans M, Stan GB & Ellis T (2015) GeneGuard: A modular plasmid system designed for biosafety. *ACS synthetic biology* 4(3):307-316.
- Zandi K, Butler G & Kharma N (2016) An Adaptive Defect Weighted Sampling Algorithm to Design Pseudoknotted RNA Secondary Structures. *Frontiers in genetics* 7:129.